



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação Farmácia-Bioquímica

LUANA OMENA GIATTI

**ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA NEUROTRANSMISSÃO
HIPOCAMPAL NOS MECANISMO CENTRAIS DAS RESPOSTAS
COMPORTAMENTAIS AO ESTRESSE CRÔNICO REPETIDO**

Araraquara, SP

2022

LUANA OMENA GIATTI

**ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA NEUROTRANSMISSÃO
HIPOCAMPAL NOS MECANISMO CENTRAIS DAS RESPOSTAS
COMPORTAMENTAIS AO ESTRESSE CRÔNICO REPETIDO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutico(a) Bioquímico(a).

Orientador(a): Prof.(a). Dr.(a). Carlos Cesar Crestani

Coorientador. (a): Prof. Dr. Cristiane Busnardo Santiago

Araraquara, SP

2022

G436e Giatti, Luana Omena.
Estudo do envolvimento da neurotransmissão hipocampal nos
mecanismos centrais das respostas comportamentais ao estresse crônico
repetido / Luana Omena Giatti. – Araraquara: [S.n.], 2022.
48 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação: Farmácia Bioquímica).
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de
Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Carlos Cesar Crestani.
Coorientadora: Cristiane Busnardo Santiago.

1. Hipocampo. 2. Respostas comportamentais. 3. Estresse crônico de
restrição. 4. Ratos transgênicos c-Fos-lacZ. I. Crestani, Carlos Cesar, orient.
II. Santiago, Cristiane Busnardo, coorient. III. Título.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais
que sempre apoiarão minhas escolhas,
por todo amor e acolhimento em momentos
de angústia e felicidade genuína diante das
minhas conquistas.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a minha família por todo apoio, amor e confiança durante esses anos da graduação, principalmente aos meus pais Cristina Omena e Pedro Giatti.

Aos meus irmãos que escolhi para vida Thais Francielle da Silva e Raphael Silva, por estarem comigo em todos momentos da minha vida e, que me deram todo suporte necessário para conquistar o sonho de estudar em uma universidade pública.

As amigas que ganhei durante meu trajeto em Araraquara, que hoje são minha segunda família: Cecilia Xavier, Ana Caroline, Luiz Neto, Cecília Depentor. Junto com a Isabele Mazzoleni, Ana Carolina Bova, Luisa Nicoleti, Laura Tobias, Jéssika Alves, Kelle Azevedo, pela rede de apoio criada em momentos difíceis no ensino a distância durante a pandemia, minha eterna gratidão.

A minha orientadora Cristiane Busnardo, por toda sua dedicação, inteligência e carinho durante esse projeto, ao professor Carlos Crestani por me acolher em seu grupo de pesquisa me proporcionando muito aprendizado.

Ao professor Marcelo Marin, sendo o meu primeiro orientador, me ajudou a descobrir assuntos no qual me despertou muito interesse, me abrindo portas na área acadêmica. A todos do Departamento Fármacos e Medicamentos, pelo trabalho em equipe e toda experiência compartilhada, especialmente para o Gessynger Moraes, Lucas Barretto, Lucas Gomes, Bianca Meneghetti.

As entidades PEnsAD, CACIF e Bacteria por terem agregado conhecimentos além da graduação e, me proporcionarem momentos incríveis e aproximação de pessoas mais incríveis ainda.

Por fim, mas não menos importante, agradeço o apoio das instituições FCFar e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Auxílio à Pesquisa - Jovem Pesquisador # 2018/04899-1; BCO - Jovem Pesquisador # 2021/00148-4; BCO - Iniciação Científica / Fluxo Contínuo # 2021/04572-5), tornando possível a realização deste trabalho.

RESUMO

O estresse emocional causa um desequilíbrio fisiológico e psicológico no organismo. A exposição prolongada ou repetida a ameaças reais ou potenciais inicia processos adaptativos que visam minimizar o impacto do estresse sobre o organismo. Um importante processo adaptativo é a habituação das respostas fisiológicas durante a exposição repetida ao mesmo estímulo aversivo. Essas respostas fisiológicas são acompanhadas por consequências emocionais, como o desenvolvimento de transtornos de ansiedade e depressão, que parecem ser decorrentes de uma adaptação anormal do estresse. Entretanto, apesar da importância da habituação das respostas ao estresse, os mecanismos neurobiológicos e neuroquímicos envolvidos nesse processo ainda são pouco compreendidos. Sendo assim, o objetivo do presente projeto foi avaliar o efeito da inativação de neurônios hipocâmpais ventrais (através do método de inativação Daun02) ativados previamente pelo estresse de restrição sobre as respostas comportamentais associadas ao estresse crônico de restrição em ratas e ratos transgênicos c-Fos-lacZ. Os resultados mostraram que o estresse agudo (veículo+RS) ou crônico (veículo+CRS) de restrição não causou efeito relacionado à ansiedade nos testes do LCE e CA em ambos os sexos de animais lacZ. No entanto, a microinjeção bilateral de Daun02 (inativação neuronal) no hipocampo ventral (HV) promoveu um efeito do tipo ansiogênico nas ratas estressadas cronicamente (Daun02+CRS) no teste do LCE. Além disso, os dados demonstraram que o estresse crônico (veículo+CRS), mas não o estresse agudo (veículo+RS), causou um aumento no tempo de "grooming" no ST em ambos os sexos dos animais lacZ. Já no FST, o estresse agudo (veículo+RS) não causou nenhuma alteração nos parâmetros analisados (nado, escalada e imobilidade) nos ratos lacZ. No entanto, o estresse agudo (veículo+RS) causou um aumento do tempo de escalada e uma redução no tempo de imobilidade nas fêmeas que foi revertido nos animais tratados com Daun02 (Daun02+RS). O estresse crônico (veículo+CRS) causou um aumento no tempo de imobilidade nos ratos lacZ e uma redução o tempo de imobilidade nas ratas lacZ e ambas as respostas foram revertidas nos animais tratados com Daun02 (Daun02+CRS).

Palavras-chave: Hipocampo. Respostas comportamentais. Estresse crônico de restrição. Ratos transgênicos c-Fos-lacZ.

ABSTRACT

Emotional stress causes physiological and psychological imbalance in the body. Adaptive processes are triggered during repeated stress exposure that constitute important changes to minimizing stress impact on the body. An important adaptive process is physiological responses habituation during repeated exposure to the same aversive stimulus. These physiological responses are accompanied by emotional consequences such as development of anxiety and depression disorders, which appear to be due to an abnormal stress adaptation. However, even with proven importance of stress responses habituation, neurobiological and neurochemical mechanisms involved in this process are still poorly understood. Therefore, the aim of the present project was to evaluate the effect of ventral hippocampal neurons inactivation (through Daun02 inactivation method) previously activated by restraint stress on the behavioral responses associated with chronic restraint stress in female and male c-Fos-lacZ transgenic rats. The results showed that acute (vehicle+RS) or chronic (vehicle+CRS) restraint stress caused no anxiety-related effect observed in elevated plus-maze and open field tests in both gender of lacZ animals. However, bilateral microinjection of Daun02 (neuronal inactivation) into the ventral hippocampus (VH) promoted an anxiogenic-like effect observed in elevated plus-maze in chronically stressed female rats (Daun02+CRS). Furthermore, the data demonstrated that chronic stress (vehicle+CRS), but not acute stress (vehicle+RS), caused an increase in grooming time in both genders of lacZ animals. In the FST, acute stress (vehicle+RS) caused no change in the analyzed parameters (swimming, climbing and immobility times) in lacZ male rats. However, acute stress (vehicle+RS) caused an increase in climbing time and a reduction in immobility time in female rats and both responses were reverted in Daun02-treated animals (Daun02+RS). Chronic stress (vehicle+CRS) caused an increase in immobility time in lacZ male rats and a reduction in immobility time in lacZ female rats and both responses were reverted in Daun02-treated animals (Daun02+CRS).

Keywords: Hippocampus. Behavioral responses. Chronic restraint stress. c-Fos-lacZ transgenic rat.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Comparação da anatomia entre espécies	14
Figura 2 – Representação esquemática do eixo Hipotálamo - Hipófise - Adrenal (HPA)	16
Figura 3 – Método de Inativação Daun02	18
Figura 4 – Hipótese do Projeto	19
Figura 5 – Identificação dos animais para genotipagem	24
Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose, confirmação da presença do gene lacZ	30
Figura 7 – Avaliação histológica de esfregaço vaginal de uma rata representativa do grupo	31
Figura 8 – Fotomicrografia: Indicando os locais da injeção no HV	32
Figura 9 – Efeitos comportamentais observados 24h após o Estresse Agudo de Restrição no Labirinto em Cruz Elevado	33
Figura 10 – Efeitos comportamentais observados 24h após o Estresse Crônico de Restrição no Labirinto em Cruz Elevado	34
Figura 11 - Efeitos comportamentais observados 24h após o Estresse Agudo de Restrição no Campo Aberto	35
Figura 12 – Efeitos comportamentais observados 24h após o Estresse Crônico de Restrição no Campo Aberto	35
Figura 13 - Efeitos comportamentais observados 48h após o Estresse Agudo de Restrição no Splash Teste	37
Figura 14 – Efeitos comportamentais observados 48h após o Estresse Crônico de Restrição no Splash Teste	37
Figura 15 - Efeitos comportamentais observados 48h após o Estresse Agudo de Restrição no Nado Forçado	38
Figura 16 - Efeitos comportamentais observados 48h após o Estresse Crônico de Restrição no Nado Forçado	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
AVP	Arginina Vasopressina
CA	Campo Aberto
CRH	Hormônio Liberador de Corticotropina
CRS	Estresse Crônico de Restrição
FST	Nado Forçado
HD	Hipocampo Dorsal
HPA	Hipotálamo Hipófise Adrenal
HV	Hipocampo Ventral
IEGs	Genes de Ativação Imediata
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
PVN	Núcleo Paraventricular
RS	Estresse Agudo de Restrição
ST	Splash Test

SUMÁRIO

Dedicatória	4
Agradecimentos	5
Resumo	6
Abstract	7
Lista de Figuras	8
Lista de Abreviaturas	9
1. INTRODUÇÃO	12
1. Estresse	12
1.2 Hipocampo e Estresse	13
1.3 Rato(a)s transgênico(a)s c-Fos lacZ e Método de inativação Daun02	16
2 OBJETIVO	20
3 PROTOCOLO	21
3.1 Efeito da inativação dos neurônios previamente ativados no HV durante a exposição a um protocolo de estresse crônico repetido por meio do procedimento de inativação Daun02 em ratos e ratas transgênico(a)s c-fos-lacZ sobre o processo de habituação das respostas comportamentais do tipo ansiogênica e depressiva	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Aspectos éticos	23
4.2 Criação e Genotipagem dos animais transgênicos c-fos lacZ	23
4.3 Estresse de Restrição	25
4.4 Cirurgia de Estereotaxia	25
4.5 Microinjeção de Drogas	26
4.6 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	26
4.7 Teste do Campo Aberto (CA)	27
4.8 Teste Splash (do inglês, Splash Test - ST)	27
4.9 Nado Forçado (do inglês, Forced Swmming Test - FST)	27
4.10 Perfusão dos Animais	27
4.11 Esfregaço Vaginal (SWAB)	28
4.12 Análise Estatística	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 Genotipagem	29
5.2 Ciclo Estral	30
5.3 Representação dos sítios de Injeção no hipocampo ventral (HV)	32
5.4 Efeito da inativação dos neurônios previamente ativados no HV durante a exposição a um	

protocolo de estresse crônico repetido por meio do procedimento de inativação Daun02 em ratos e ratas transgênico(a)s c-fos-lacZ sobre o processo de habituação das respostas comportamentais do tipo ansiogênica e depressiva	32
6. Conclusão	42
REFERÊNCIAS	43

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estresse

Hans Hugo de Bruno Seyle, um endocrinologista húngaro, definiu o estresse como “a resposta neuroendócrina não específica do corpo a qualquer demanda, seja ela causada por, ou resultando, em condições favoráveis ou não favoráveis” (DE SOUSA; SILVA; GALVÃO-COELHO, 2015). A partir de estudos feitos pelo pesquisador, foi demonstrado que a exposição prolongada a estímulos nocivos, resultava em uma resposta do organismo que atravessava três estágios: (1) Reação de Alarme, o organismo se prepara para uma reação instantânea frente a um agente estressor, produzindo adrenalina e noradrenalina (ou seja, a resposta de *luta ou fuga* introduzida por Walter Cannon 1915), hidrocortisona adicional e hormônios relacionados; (2) Estágio de Resistência em que os mecanismos de defesa do organismo parecem estar maximizados, é caracterizada pela adaptação, na qual o corpo aprende a lidar com o agente estressor. Mas se persistente, levavam a uma (3) “Fase de Exaustão”, onde há um esgotamento das reservas de energia e a perda da capacidade adaptativa, levando sintomas ou doenças induzidas por estresse, podendo ser fatal (DE SOUSA; SILVA; GALVÃO-COELHO, 2015).

Recentemente, Firdaus S. Dhabhar tem proposto um novo conceito de estresse baseado nos três componentes principais do estresse (agente estressor, percepção do estresse e resposta ao estresse) (DHABHAR, 2019). Portanto o estresse é um conjunto de eventos, consistindo de um estímulo que precipita uma reação no cérebro que, por sua vez, ativa a resposta de “*luta e fuga*” (DHABHAR, 2019). Sabe-se que o estresse causa um desbalanço da homeostase, desencadeando respostas fisiológicas com o intuito de manter a integridade do organismo que é essencial para o bem-estar físico e mental do indivíduo. Estas Respostas ao estresse são proporcionais à natureza do estímulo, podendo ter efeitos positivos / protetores ou efeitos negativos / prejudiciais de curto versus longo prazo, respectivamente (DHABHAR, 2019). Desta forma, um conjunto eficiente de sistemas interligados são acionados sendo simpático-adrenal medular e hipotálamo-hipófise-adrenocortical (HPA), os sistemas primários para o restabelecimento da homeostase durante o estresse.

O eixo HPA funciona como um sistema biológico responsável para a propagação de respostas ao estresse em humanos e outros organismos (GUNNAR; QUEVEDO, 2007; SHAPERO *et al.*, 2019). Dessa forma, frente ao estresse, o núcleo paraventricular do hipotálamo (no inglês, paraventricular nucleus of hypothalamus, PVN) aumenta a fração de

hormônio liberador de corticotropina (no inglês, corticotropin-releasing hormone, CRH), e arginina vasopressina (AVP), liberados na glândula pituitária ou hipófise anterior, que, por sua vez, libera o hormônio adrenocorticotrófico (no inglês, adrenocorticotrophic hormone, ACTH), estimulando a produção de cortisol do córtex das glândulas adrenais ou suprarrenais (SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000; SHAPERO *et al.*, 2019). Desempenhando um papel fundamental no controle de inúmeras atividades, o cortisol (corticosterona em roedores), atua em sistemas corporais periféricos, incluindo os sistemas metabólico e imunológico e também no sistema nervoso central, envolvido em funções cognitivas como aprendizagem e memória e emoções, além de fornecer feedback negativo para a liberação de CRH e ACTH, limitando a atividade do eixo HPA (SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000; SHAPERO *et al.*, 2019). Anormalidades no eixo HPA, podendo ser causadas por exposição elevada ao estresse, possivelmente resultam em uma desregulação do sistema, levando a uma produção excessiva de cortisol. Pesquisas sugerem que essa superprodução de cortisol pode modular o funcionamento de regiões cerebrais envolvidas na depressão, como o hipocampo, o córtex pré-frontal e a amígdala (MCEWEN, 2009; SHAPERO *et al.*, 2019). Analisando a relação entre estresse e o funcionamento do eixo HPA, a importância de estudar a vulnerabilidade ao estresse fica notória para compreensão de diversas etiologias patológicas, como a depressão (SHAPERO *et al.*, 2019).

Para estudos experimentais e análises de respostas agudas (imediate) e crônicas (exposição repetida a ameaças aversivas, previsíveis ou imprevisíveis) ao estresse, são utilizados modelos animais de alterações comportamentais induzidas pelo estresse, por exemplo o modelo do estresse por restrição, um modelo clássico de estresse não condicionado e inescapável padronizado na literatura (CRESTANI, 2016; LIN; SCOTT, 2009).

1.2 Hipocampo e estresse

O hipocampo é parte do sistema límbico e nos roedores está, anatomicamente, dividido em ventral (no inglês, ventral hippocampus – VH), que corresponde ao hipocampo anterior nos primatas; e dorsal (no inglês, dorsal hippocampus – DH), que corresponde ao hipocampo posterior nos primatas) (STRANGE *et al.*, 2014). O eixo longitudinal é descrito como ventrodorsal em roedores e anteroposterior em primatas (também conhecido como rostrocaudal em primatas não humanos) (STRANGE *et al.*, 2014). O hipocampo é formado pelas regiões do giro denteado e das regiões CA1 a CA3 nos roedores e CA1 e CA4 nos primatas (STRANGE *et al.*, 2014). A visão dominante é que o hipocampo dorsal (ou posterior) está implicado em funções cognitivas como aprendizado e memória e na navegação espacial

e o hipocampo ventral (ou anterior) medeia comportamentos relacionados à ansiedade, estresse, emoções, afeto (STRANGE *et al.*, 2014) (Figura 1).

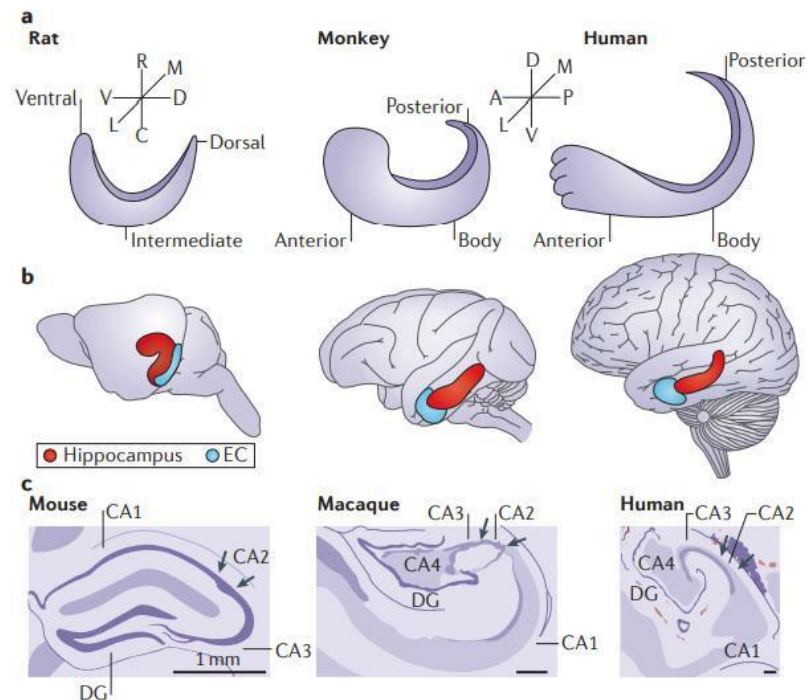


Figura 1. Comparação da anatomia do hipocampo entre espécies. a) Ilustrações esquemáticas da orientação do eixo longo do hipocampo em ratos, macacos e humanos. b) O eixo completo do hipocampo (vermelho) pode ser visto em cérebros de ratos, macacos e humanos, com o córtex entorrinal (EC) mostrado em azul. c) Desenhos de cortes transversais de Nissl de hipocampus de camundongos, macacos e humanos. A, anterior; C, caudal; D, dorsal; DG, giro denteado; L, lateral; M, medial; P, posterior; R, rostral; V, ventral. O painel A é adaptado com permissão da REF. 171, Copyright © 1993 Wiley-Liss, Inc., A Wiley Company. O painel C é da REF. 54, Grupo de Publicação da Natureza (Retirado de Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. Bryan A. Strange, Menno P. Witter, Ed S. Lein & Edvard I. Moser. Nature Reviews Neuroscience volume 15, pages655–669, 2014).

O hipocampo é uma região cerebral importante na sinalização da resposta ao estresse crônico, devido às conexões anatômicas diretas e indiretas com o eixo HPA (CHRISTIAN *et al.*, 2011). Tradicionalmente, o hipocampo está envolvido na modulação de processos cognitivos, como aprendizado e memória, mas também participa de comportamentos defensivos relacionados à ansiedade e adaptação comportamental ao estresse (Padovan e Guimaraes, 1993; Holland and Bouton 1999; Clark, Zola, and Squire 2000; Bannerman *et al.* 2004; Bertoglio, Joca, and Guimarães 2006; Wiltgen *et al.* 2006; Bird and Burgess 2008; Scopinho *et al.* 2013). O hipocampo possui grande densidade de receptores mineralocorticóides que possuem alta afinidade pelos glicocorticóides endógenos e determinam a atividade basal do eixo HPA. Os receptores de glicocorticóides, por outro lado,

são encontrados principalmente no hipotálamo e na hipófise anterior e estão envolvidos apenas nas fases de pico do ritmo circadiano e durante o estresse, quando os níveis de glicocorticóides estão elevados (Figura 2) (PAPADOPOULOS; CLEARE, 2012). Resultados de estudos anteriores demonstraram que o estresse pode causar mudanças funcionais e estruturais na região do hipocampo (HABIB *et al.*, 2017; JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003; MCEWEN, 2009). Por exemplo, após 21 dias consecutivos de estresse de restrição, os neurônios piramidais CA3 mostraram uma diminuição na ramificação dendrítica apical e no comprimento dendrítico total, enquanto os dendritos basais permaneceram inalterados (WATANABE; GOULD; MCEWEN, 1992). Além disso, no hipocampo foram encontrados níveis aumentados de mRNA de proteína de membrana associada a vesícula 2 (VAMP2) e proteína associada ao sinaptosoma 29kDa (SNAP-29) e uma diminuição nos níveis de VAMP1, proteínas sinápticas envolvidas na exocitose da vesícula sináptica (MÜLLER *et al.*, 2011), o que pode contribuir para as alterações morfológicas, funcionais e comportamentais observadas em modelos experimentais de estresse. Adicionalmente, a exposição repetida ao mesmo estressor resulta em diminuição progressiva da magnitude da resposta da corticosterona e do ACTH, menor exploração dos braços abertos no teste labirinto em cruz elevado (comportamento preditivo de ansiedade) e maior imobilidade no teste do nado forçado (um comportamento preditivo de depressão) (CHIBA *et al.*, 2012; GIROTTI *et al.*, 2006), sugerindo que a habituação de algumas respostas ao estresse crônico são bem sucedidas e outras, não. E os mecanismos envolvidos na adaptação das respostas ao estresse ainda estão pouco elucidados.

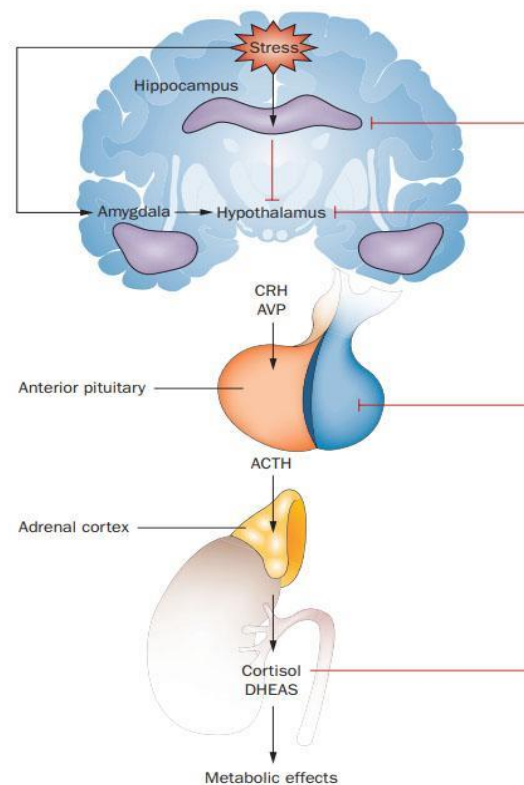


Figura 2. Representação esquemática do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). A ativação dos neurônios parvocelulares no núcleo paraventricular do hipotálamo leva à síntese de CRH e AVP. Ambos são secretados no sistema porta hipofisário que transporta esses hormônios para a hipófise anterior. CRH e AVP atuam sinergicamente na hipófise para estimular a liberação de ACTH, que por sua vez atua nas suprarrenais para estimular a síntese e liberação de corticosteróides. Os corticosteróides regulam sua própria secreção por meio de um mecanismo de controle de feedback negativo, que é exercido através de receptores mineralocorticóides e glicocorticóides no nível do hipocampo, hipotálamo e glândula pituitária. ACTH, hormônio adrenocorticotrófico; AVP, arginina vasopressina; CRH, hormônio liberador de corticotropina; DHEAS, sulfato de dehidroepiandrosterona. Permissão obtida da Macmillan Publishers © Sandi, C. Nat. Rev. Neurosci. 5, 917-930 (2004) (Retirado de Andrew S. Papadopoulos & Anthony J. Hypothalamic–pituitary–adrenal axis dysfunction in chronic fatigue syndrome. *Clear Nature Reviews Endocrinology* volume 8, pages22–32, 2012)

Outra característica relevante do hipocampo é que existem diferenças sexuais em sua morfologia e na propriedade eletrofisiológica de seus neurônios (YAGI; GALEA, 2019). Estudos anteriores mostraram que ratos apresentaram maiores interseções dendríticas em neurônios do giro denteado, enquanto que as ratas apresentaram maiores pontos de ramificação nos dendritos basais dos neurônios piramidais CA3 (YAGI; GALEA, 2019). Além disso, parecem existir diferenças sexuais proeminentes na neurogênese e na ativação de novos neurônios no hipocampo em resposta a tarefas cognitivas em roedores (YAGI; GALEA,

2019). Também existem diferenças sexuais na regulação do eixo HPA que são atribuídas ao aumento da atividade nervosa do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (KUDIELKA; KIRSCHBAUM, 2005; STROUD; SALOVEY; EPEL, 2002; “Sex Differences in the Brain: From Genes to Behavior - Oxford Scholarship”, n.d.). Estudos em humanos e animais indicam que as fêmeas têm respostas de cortisol/corticosterona maiores e mais persistentes quando submetidas a uma situação estressante (GOEL *et al.*, 2014; JONES; BRUSH; NEAME, 1972; KITAY, 1961; KUDIELKA; KIRSCHBAUM, 2005; STROUD; SALOVEY; EPEL, 2002; “Sex Differences in the Brain: From Genes to Behavior - Oxford Scholarship”, n.d.), o que pode contribuir para uma maior vulnerabilidade à depressão. Portanto, estudar as diferenças sexuais em distúrbios de humor é extremamente importante, pois existem diferenças sexuais na prevalência e na manifestação de certas doenças; e na eficácia do tratamento (BROOKMEYER; GRAY; KAWAS, 2004; GALEN, 1999; GUTIÉRREZ-LOBOS *et al.*, 2002; IRVINE *et al.*, 2012).

1.3 Rato(a)s transgênico(a)s c-fos lacZ e método de inativação Daun02

O mapeamento funcional dos padrões de ativação neuronal em processos fisiológicos e patológicos pode oferecer uma visão significativa na compreensão dos mecanismos cerebrais (MATCHYNSKI *et al.*, 2021). O proto-oncogene c-Fos é o homólogo celular do oncogene viral v-Fos, sendo denominado gene de ativação imediata (IEGs – Immediate Early Genes), uma vez, que é expresso de forma rápida e transitória em vários tecidos após diferentes tipos de estímulos (CURRAN *et al.*, 1983; SAGAR; SHARP; CURRAN, 1988), sendo considerado uma ferramenta importante, utilizada para mapeamento da atividade funcional do cérebro. Para facilitar o uso do mapeamento IEG, foram produzidos ratos transgênicos que carregam um gene de fusão fos-lacZ que recapitula a expressão de c-fos (KASOF *et al.*, 1995, 1996). Nestes animais, uma proteína de fusão Fos- β -galactosidase é direcionada para o núcleo celular (SCHILLING *et al.*, 1991). O transgene nestes ratos contém um promotor c-fos que regula a transcrição do gene bacteriano lacZ, que codifica a enzima β -galactosidase (KASOF *et al.*, 1995). A β -galactosidase é induzida com um curso de tempo semelhante, relação dose-resposta, como a proteína Fos e é co-induzida em todos os neurônios marcados com Fos, indicando seu uso como marcador de neurônios ativados (KASOF *et al.*, 1995).

Para o método de inativação Daun02 (Figura 3), é utilizado o fármaco inerte Daun02, derivado da antraciclina, sendo um substrato da β -galactosidase, enzima em neurônios que expressam c-Fos. O Daun02 é biologicamente inativo, tornando-se ativo quando convertido, pela enzima β -galactosidase, em daunorrubicina (conhecido também como daunomicina), que

causa morte celular apoptótica e bloqueio dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Figura 3) (KOYA; MARGETTS-SMITH; HOPE, 2016). Daun02 foi projetado para manipular apenas os neurônios que são ativados por estímulos ou eventos específicos sem afetar os neurônios não ativados ou neurônios que são ativados por outros estímulos ou eventos (CRUZ *et al.*, 2013). Assim, utilizamos o procedimento de inativação Daun02 para avaliar a participação dos neurônios hipocampus ventrais, ativados anteriormente pelo estresse crônico de restrição, sobre as respostas comportamentais induzidas pelo estresse em ratos e ratas transgênicos(a)se, dessa forma, confirmar ou refutar a hipótese de que o HV facilita ou inibe as respostas comportamentais induzidas pelo CRS (Figura 4).

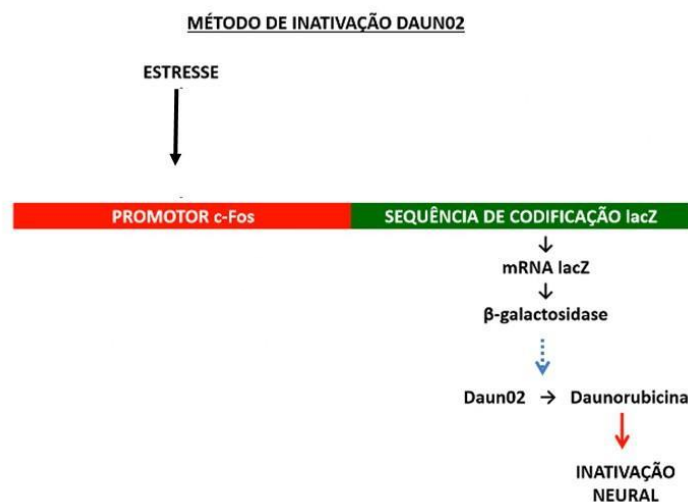


Figura 3. Mecanismo esquemático do procedimento de inativação Daun02 em rato(a)s c-fos-lacZ. O transgene c-fos–lacZ possuiu um promotor c-fos que conduz a expressão de lacZ, que codifica a proteína beta-galactosidase (β-gal). A β-gal catalisa a conversão do pró-fármaco Daun02 em daunorrubicina, promovendo inativação neural. Desse modo, atividade neuronal provocada pelo estresse de restrição induz a expressão de β-galactosidase e expressão de Fos em neurônios no hipocampo ventral de ratos sequenciados com a c-fos-lacZ.

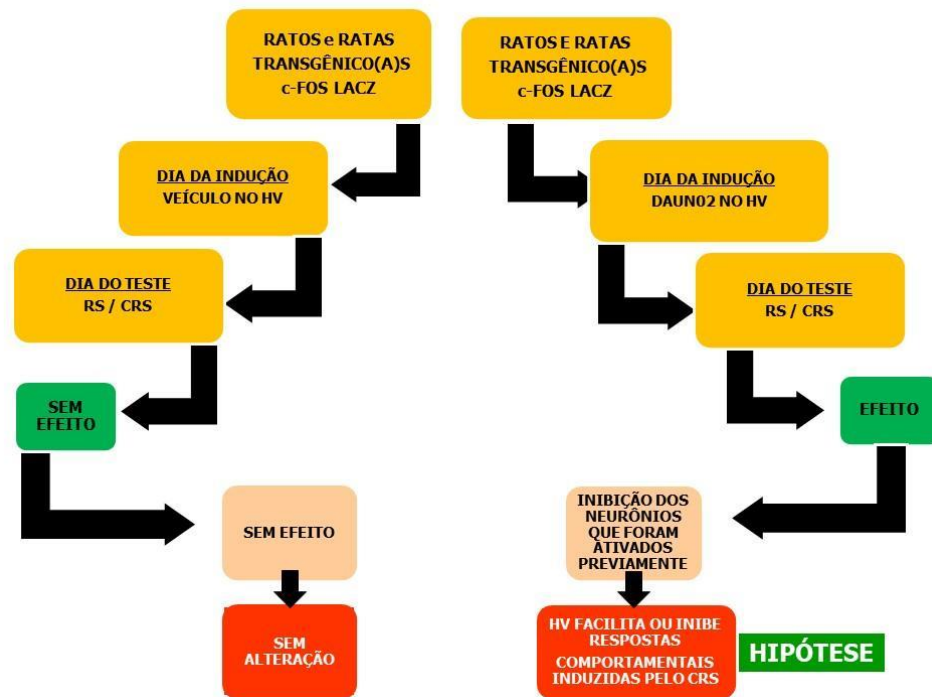


Figura 4. Hipótese do projeto: O hipocampo ventral (HV) facilita ou inibe as respostas comportamentais induzidas pelo estresse crônico de restrição (CRS). RS – estresse agudo de restrição.

2. OBJETIVO

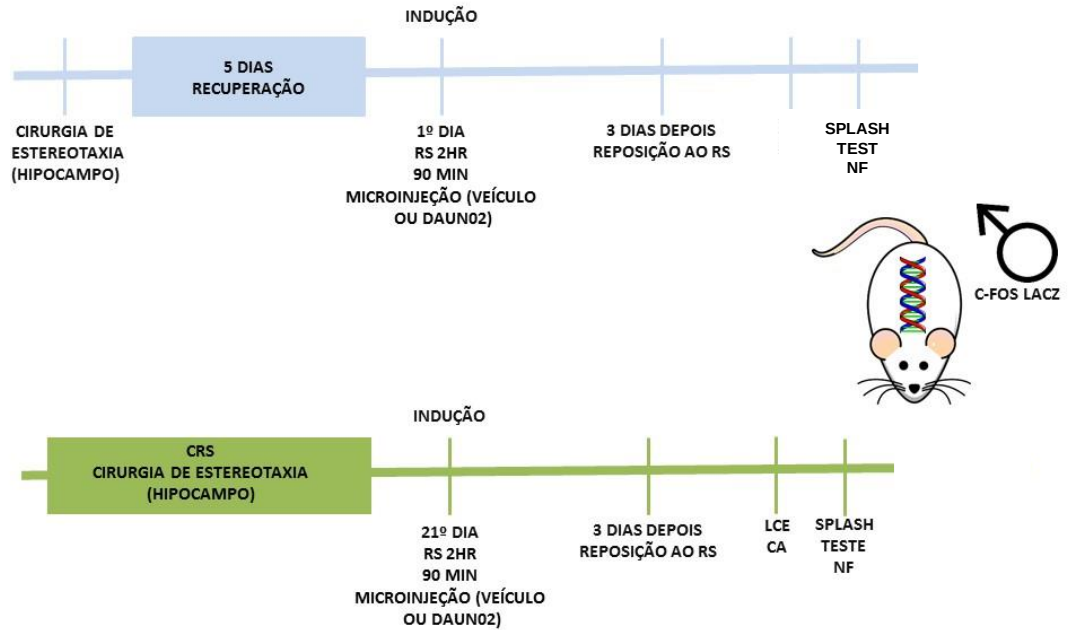
- Estudar o efeito da inativação dos neurônios previamente ativados no HV durante a exposição a um protocolo de estresse crônico repetido por meio do procedimento de inativação Daun02 em ratas e ratos transgênicos c-fos-lacZ sobre o processo de habituação das respostas comportamentais do tipo ansiogênicas e do tipo depressivas induzidas pelo estresse.

3. PROTOCOLO

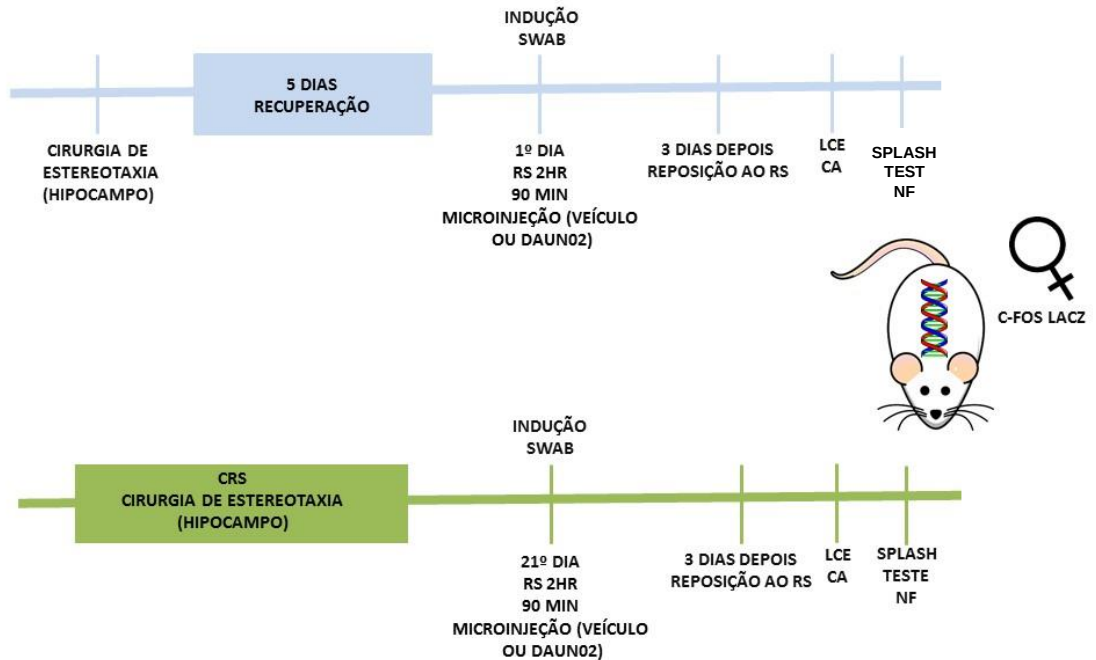
3.1 Efeito da inativação dos neurônios previamente ativados no HV durante a exposição a um protocolo de estresse crônico repetido por meio do procedimento de inativação Daun02 em ratos e ratas transgênico(a)s c-fos-lacZ sobre o processo de habituação das respostas comportamentais do tipo ansiogênica e depressiva.

O objetivo deste protocolo é investigar o envolvimento do Hipocampo Ventral no processo de habituação das respostas comportamentais do tipo ansiogênica e/ou do tipo depressiva observados durante a exposição aguda e crônica ao estresse por restrição. Para isso, os animais foram divididos em 4 grupos experimentais para cada sexo (macho e fêmea): 1º Grupo: RS + Veículo, no qual os animais foram submetidos a uma única sessão de 2h de estresse por restrição e receberam injeção intra-hipocampal de veículo [5% dimetilsulfóxido (DMSO) e 6% polisorbato 80 (Tween 80) em 89% de tampão fosfato-Salina (PBS), 200nL/sítio] 90 minutos após a 1ª sessão de restrição; 2º Grupo: RS + Daun02, no qual os animais foram submetidos a uma única sessão de 2h de estresse por restrição e receberam injeção intra-hipocampal de Daun02 (200nL/sítio) 90 minutos após a 1ª sessão de restrição; 3º Grupo: CRS (Estresse de Restrição Crônico) + Veículo, no qual os animais foram submetidos a sessões diárias de 2h de estresse por restrição por 21 dias e receberam injeção intra-hipocampal de veículo (5% DMSO e 6% Tween 80 em 89% PBS), 200nL/sítio] 90 minutos após a 21ª sessão de restrição; 4º Grupo: CRS + Daun02, no qual os animais foram submetidos a sessões diárias de 2h de estresse por restrição por 21 dias e receberam injeção intra-hipocampal de Daun02 (200nL/sítio) 90 minutos após a 21ª sessão de restrição. O 1º dia (estresse agudo), e o 21º dias (estresse crônico), foram considerados os dias de indução. Três dias após o dia da indução os animais de todos os grupos experimentais foram submetidos a uma nova sessão de restrição. Vinte quatro e quarenta e oito horas após a reposição a sessão de estresse restrição, o comportamento dos animais foi avaliado, respectivamente, no labirinto em cruz elevado e no teste do campo aberto para avaliação de comportamentos relacionados à ansiedade, e no teste do nado forçado e no teste “splash” para avaliação de comportamentos relacionados à depressão. Para os testes comportamentais, foram incluídos um grupo “naive” (não-estressado). Os animais naive foram mantidos no biotério sem serem incomodados, exceto no período de limpeza das caixas, pelo mesmo período que os animais estressados. Segue abaixo o desenho experimental completo do presente do protocolo e o método de inativação Daun02. A escolha da concentração de Daun02 foi baseada em dados anteriores da literatura (Koya, Margetts-Smith, and Hope 2016), abaixo a ilustração do protocolo descrito.

GRUPO 1 e 2 – ESTRESSE AGUDO DE RESTRIÇÃO (RS) – 2h/DIA POR 1 DIA E VEÍCULO/DAUN02 NO HIPOCAMPO
GRUPO 3 e 4 – ESTRESSE CRÔNICO DE RESTRIÇÃO (CRS) – 2h/DIA POR 21 DIAS E VEÍCULO/DAUN02 NO HIPOCAMPO



GRUPO 1 e 2 – ESTRESSE AGUDO DE RESTRIÇÃO (RS) – 2h/DIA POR 1 DIA E VEÍCULO/DAUN02 NO HIPOCAMPO
GRUPO 3 e 4 – ESTRESSE CRÔNICO DE RESTRIÇÃO (CRS) – 2h/DIA POR 21 DIAS E VEÍCULO/DAUN02 NO HIPOCAMPO



4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Foram utilizados ratos e ratas transgênico(a)s c-Fos-lacZ Wistar, adultos jovens, em torno de 60 dias e com o peso de aproximadamente 250 g. Os animais foram criados no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAR) da Unesp. Os animais tiveram acesso livre a ração granulada e água, exceto durante o período experimental e foram submetidos à alternância de luz (12h claro/ 12h escuro). Os experimentos foram realizados durante o período da manhã, a fim de minimizar possíveis interferências do ritmo circadiano. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCFAR-UNESP (protocolo: CEUA/FCF/CAR: 02/2021).

4.2 Criação e Genotipagem dos animais transgênicos c-fos lacZ

Animais transgênicos c-Fos-lacZ Wistar machos e fêmeas, foram fornecidos pelo Professor Fábio Cardoso Cruz do Departamento de Farmacologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), São Paulo/SP. Como a demanda de animais para o projeto era grande, parte desses animais foram utilizados nos experimentos e a outra parte desses animais foram utilizados como matrizes para criação no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAR). Para criação, os animais foram alojados em caixas, no qual foram colocados em trios, duas fêmeas do tipo selvagem para um macho transgênico e duas fêmeas transgênicas para um macho do tipo selvagem. No 21º dia de nascimento desses animais, foi feito o desmame e eles foram separados por sexo em até seis animais por caixa. Para identificação dos animais de interesse, ou seja, aqueles que expressaram a transgenia, foram coletas amostras biológicas das orelhas em tubos de microcentrífuga de 1,5mL numerados. Foi utilizado álcool etílico hidratado 70º para esterilização da tesoura entre os ratos. A coleta das amostras e a identificação dos animais foram feitos através de um pequeno corte em locais distintos da na orelha do animal, conforme exemplificado na figura abaixo (Figura 5):

COLETA E IDENTIFICAÇÃO PARA GENOTIPAGEM DE RATOS TRANSGÊNICOS C-FOS LACZ

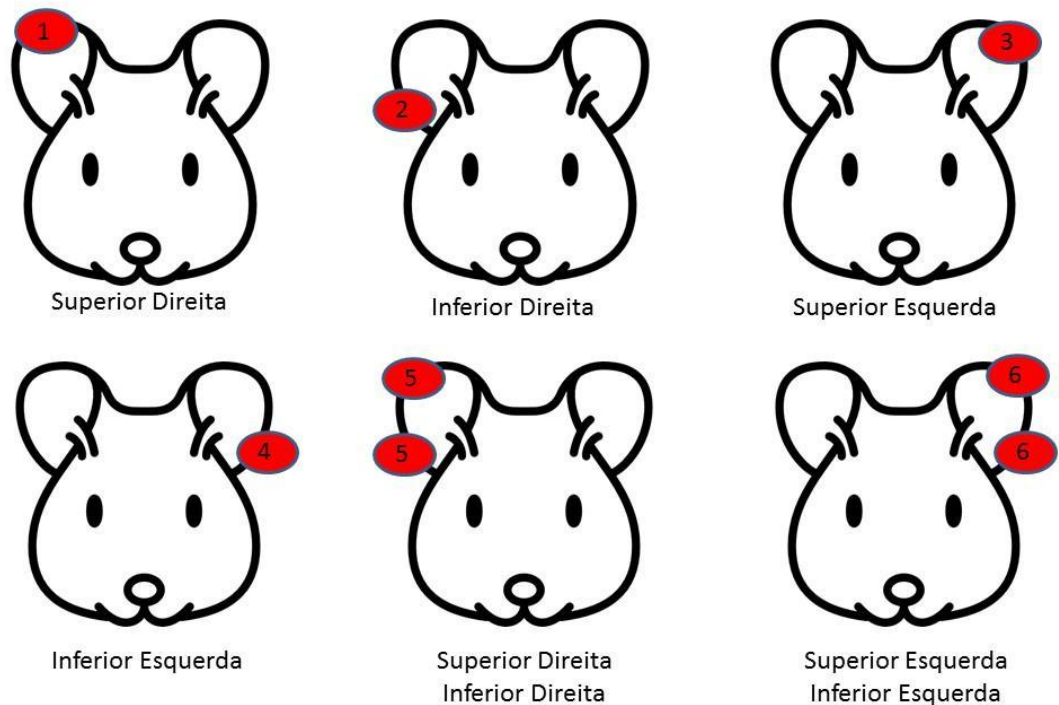


Figura 5. Identificação dos animais para genotipagem: Para coletar as amostras biológicas das orelhas, os animais eram manuseados de costas para o experimentador, na figura os animais estão representados olhando para o experimentador. As marcações realizadas representavam as numerações de 1 a 6.

Nos tubos de microcentrífuga, contendo as amostras, foram adicionadas 300 μ L de NaOH 50 mM e foram incubados a 95°C por 60 minutos. Em seguida, os tubos foram vortexados em potência média por 5 segundos e girados rapidamente para reduzir a condensação. As amostras foram neutralizadas adicionando-se 30 μ L de 1M Tris-HCl (pH 8) (Trizma® hydrochloride solution 1M Cat no.T2694-1L, Sigma), vortexadas em potência média (12000 rpm) por 5 segundos e giradas rapidamente para reduzir a condensação. O material não digerido permaneceu no fundo do tubo e o sobrenadante (material de interesse) foi retirado cuidadosamente com uma pipeta ('DNA genômico lisado') para a reação em cadeia da polimerase (PCR). Posteriormente, foi adicionado 1 μ L de lisado de DNA genômico à "mistura principal" Master Mix de PCR (OneTaq DNA polymerase Mastermix (Cat no. M0482S, New England Biolabs); Oligos (IDT DNA technologies, standard synthesis, and desalting preparation); PCR primers forward sequence: TTGCAGTGCACGGCAGATACACTTGCTGA; reverse sequence GCCACTGGTGTGGGCCATAATTCAATTTCG); 100bp DNA ladder (Cat no. N3231S, New England Biolabs). Para a reação de PCR, as foram utilizadas as seguintes condições de reação no termociclador: 94 °C - HOLD (partida a quente); 95 °C - 5 min; 95 °C - 15 seg;

60 °C – 15 seg; 72°C - 30 seg; 72°C – 3 min; 4 °C – HOLD (fim do programa). Os produtos da reação de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% em 1x TAE buffer (Cat no. 15558-026, ThermoFisher Scientific). A adição de 0,5 µg de brometo de etídio por 1 mL de solução de agarose indicou a posição dos produtos de PCR (KOYA; MARGETTS-SMITH; HOPE, 2016). A Eletroforese em gel foi utilizado para separar fragmentos de DNA com base no tamanho e carga, que envolve uma passagem de uma corrente através de um gel. O gel é pigmentado com um corante que se liga ao DNA e os fragmentos de DNA podem ser vistos como bandas que foram analisadas através do software Alliance.

4.3 Estresse de Restrição

O modelo experimental de estresse por restrição é largamente utilizado em roedores, pela sua fácil execução sem causar dor ou danos ao animal. Além disso, esse estressor produz respostas fisiológicas e comportamentais que são distintas e facilmente reprodutíveis (Bali & Jaggi, 2015). Para esse modelo de estresse, os animais foram introduzidos em tubos cilíndricos plásticos (diâmetro=6,5 cm e comprimento=25 cm), ventilados por orifícios (1 cm de diâmetro). A restrição durou 2 horas, em sessão aguda (1 dia) e em exposição repetida (crônica, 21 dias consecutivos). No final de cada sessão de estresse, os animais retornaram às suas respectivas caixas (home cages). Os animais que não foram submetidos à restrição (naive) permaneceram em suas caixas (BUSNARDO *et al.*, 2019).

4.4 Cirurgia de Estereotaxia

A estereotaxia consiste em um procedimento com alta precisão baseado nas coordenadas cartesianas. As coordenadas estereotáticas para implantação de cânulas guia no hipocampo ventral foram definidas segundo atlas de cérebro de rato Paxinos e Watson, 1986: ântero-posterior: - 5mm a partir do bregma; lateral: +5 mm em relação à linha média; vertical: - 4mm abaixo do osso; abaixamento da barra do incisivo: 3,2 mm. Os animais foram anestesiados com uma mistura de 5 mL ketamina e 1,6 mL de xilazina no volume de 0,1mL para cada 100g de peso do animal. Após a tricotomia, a cabeça do rato foi imobilizada em um estereotático e foi realizada assepsia do campo cirúrgico com iodopovidina ou álcool a 70%. Para redução do sangramento durante a cirurgia foi injetado 0,3 mL de solução de lidocaína com vasoconstritor. A calota craniana foi exposta por meio de uma incisão na pele, de aproximadamente 1,5 cm, afastando-se completamente o perióstio. A limpeza da região foi feita com solução salina e água oxigenada a 10%. Após o posicionamento da cânula de aço inoxidável, um orifício foi feito no crânio com auxílio de broca odontológica, por ele foram introduzida à cânula constituída por um segmento de agulha hipodérmica (26 x 0,55 mm;

24G), com 12 mm de comprimento. As cânulas foram fixadas ao crânio com resina acrílica autopolimerizável e pequenos parafusos, previamente implantados na calota craniana. Um mandril com 0,2 mm de diâmetro externo foi introduzido nas cânulas, evitando a sua obstrução durante o período de recuperação do animal. Como medida profilática, ao final da cirurgia, o animal recebeu 0,2 mL de pentabiótico veterinário com estreptomicinas e penicilinas, para prevenir a infecção e 2,5mg/kg do antiinflamatório flunixinina meglumina subcutaneamente para analgesia pós-operatória (BUSNARDO *et al.*, 2019).

4.5 Microinjeção de Drogas

Daun02 (Peso Molecular = 884,79) é um pró-fármaco derivado da antraciclina inativa. Daun02 torna-se biologicamente ativo quando é convertido em daunorrubicina (também conhecida como daunomicina) pela proteína bacteriana β -gal. O Daun02 foi dissolvido em veículo [89% de salina tamponada com fosfato (Phosphate Buffered Saline - PBS) 0.01M, 5% dimetilsulfóxido (DMSO) e 6% de Tween-80]. A droga foi preparada e armazenada em freezer -20 até o dia do experimento. O veículo e o Daun02 (2 μ g/0.5 μ L) foram injetados bilateralmente no hipocampo ventral, utilizando-se uma seringa de 2 μ L (KH7002, Hamilton, EUA) conectada a um tubo de polietileno (PE-10) e uma agulha injetora (30G, Small Parts, Miami Lakes, FL, USA). A agulha foi 1 mm mais longa que a cânula guia fixada ao crânio (BUSNARDO *et al.*, 2019).

4.6 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O teste de labirinto em cruz elevado representa importante instrumento de pesquisa na área experimental para estudos de comportamentos relacionados à ansiedade. Resumidamente, o LCE consistia de dois braços abertos opostos (50x10 cm) cruzados em ângulo reto por dois braços fechados (50x10x40 cm). O labirinto está localizado a 50 cm acima do chão. Roedores naturalmente evitam os braços abertos do LCE e drogas ansiolíticas tipicamente aumentam a exploração destes braços sem alterar o número de entradas no braço fechado. O software Any Maze TM (versão 4.7, Stoelting) foi empregado para análise comportamental. Ele detecta a posição do animal no labirinto e calcula o número de entradas e tempo gasto nos braços abertos e fechados (BUSNARDO *et al.*, 2019).

4.7 Teste do Campo Aberto (CA)

O teste CA foi realizado em uma arena de madeira, medindo 60 x 60 cm, com paredes laterais de 40 cm de altura, 5 min depois dos animais serem submetidos ao teste do LCE. Os roedores exibem uma aversão natural a áreas abertas com muita luz. O software Any Maze TM (versão 4.7, Stoelting) foi empregado para análise comportamental. Ele detecta a posição do animal no campo aberto e calcula o número de entradas e tempo gasto na periferia (áreas com paredes laterais) e no centro (áreas sem contato com paredes laterais) (BUSNARDO *et al.*, 2019).

4.8 Teste Splash (do inglês Splash Test - ST)

Consiste em esguichar uma solução de sacarose a 10% na camada dorsal do animal em sua gaiola. Por causa de sua viscosidade, a solução de sacarose suja a pele do animal e ele inicia o comportamento de limpeza. Após a aplicação da solução de sacarose, o tempo gasto na limpeza foi registrado por um período de 5 minutos como um índice de autocuidado e comportamento motivacional. O teste foi registrado em vídeo para posterior análise pelo programa X-Plo-Rat 2005 (BUSNARDO *et al.*, 2019).

4.9 Nado Forçado (do inglês, forced swimming test – FST)

Os animais foram submetidos ao teste em cilindros com água na temperatura média de $25 \pm 2^\circ \text{C}$. Os testes foram realizados individualmente por 5 minutos para registro comportamental. Não foi feito o pré-teste. O teste foi registrado em vídeo para posterior análise. O tempo gasto nos seguintes comportamentos será mensurado: flutuação, escalada e natação pelo programa X-Plo-Rat 2005 (BUSNARDO *et al.*, 2019).

4.10 Perfusão dos Animais

Foram preparadas as soluções de 1x PBS, 4% de paraformaldeído (PFA) e 30% de sacarose (em PBS). Estes foram configurados juntamente com o equipamento de perfusão antes do início do teste comportamental. Foi preparado aproximadamente 100 mL de PBS e 500 mL de PFA a 4% por rato. Em seguida, os animais foram anestesiados com uretana na dose de 1,25 g/kg, intraperitonealmente (i.p.). Usando uma pinça hemostática, o processo xifóide foi exposto e a parede anterior do corpo levantada. Os músculos abdominais ao longo da margem inferior das costelas e o diafragma ao longo de sua fixação às margens ventral e lateral da caixa torácica foram cortados. A parte lateral da caixa torácica em ambos os lados até a clavícula foi cortada. Usando uma tesoura pequena, foi feito um corte transversal através

do aspecto posterior esquerdo do coração para abrir o ventrículo esquerdo do rato (no vértice do coração). Após confirmar o posicionamento da ponta da agulha, foi feita uma pequena incisão no átrio direito para fazer uma saída. Em seguida, a bomba de perfusão foi ligada e perfundiu PBS no animal a uma taxa de fluxo de 30 mL/min. Uma vez que o PBS substituiu o sangue no sistema vascular do animal e o fluido que escapa do átrio estava claro, a entrada da bomba do PBS foi transferida para a solução de PFA a 4%. Posteriormente, os animais foram decapitados usando uma guilhotina e os encéfalos removidos. Os cérebros foram pós-fixados por imersão em 4% PFA por 1-4 horas e transferidos para um pequeno recipiente (por exemplo, tubo cônico de 50 ml) contendo 30% de solução de sacarose diluída em PBS. Os cérebros devem permanecer nesta solução de sacarose a 4°C até afundar no fundo (o que pode levar de 2 a 3 dias). Uma vez afundando, os cérebros podem ser armazenados a -80°C durante a noite (ou até uso posterior) (BUSNARDO *et al.*, 2019).

4.11 Esfregaço vaginal (SWAB)

A avaliação de alterações na morfologia do epitélio vaginal, em animais de laboratório que ovulam espontaneamente é um método não invasivo utilizado para determinar os ciclos reprodutivos desses mamíferos (SEPÚLVEDA ANGULO *et al.*, 2012). O Papanicolau fornece um índice do estado funcional do eixo hipotálamo-hipófise-ovariano (SEPÚLVEDA ANGULO *et al.*, 2012). A ciclicidade ovariana tem um efeito profundo na maioria dos sistemas do corpo, como o sistema nervoso (SEPÚLVEDA ANGULO *et al.*, 2012). Essas mudanças produzem efeitos significativos para o experimento, esses efeitos temporários alteram, por exemplo, o comportamento locomotor e a cognição, que variam marcadamente com o estado do ciclo estral, e por isso, a importância da sua utilização (SEPÚLVEDA ANGULO *et al.*, 2012).

As ratas foram imobilizadas e foi introduzida delicadamente a extremidade da haste de algodão flexível (swab) com solução salina (NaCl a 0,9%) no canal vaginal a uma profundidade de aproximadamente 1-2mm, sendo realizado movimentos suaves de rotação em torno do eixo da haste do swab. Em seguida, foi retirado o swab delicadamente do canal vaginal e friccionado contra uma lâmina de vidro histológica para realizar a visualização em microscópio (CORA; KOOISTRA; TRAVLOS, 2015). As imagens foram capturadas em um microscópio acoplado a uma câmera (Zeiss Axioskop 2), utilizando o software ImageJ (versão 1.52q; site: <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>).

4.12 Análise Estatística

A percentagem de entradas ($100 \times \text{aberto} / \text{total de entradas}$) e o tempo despendido nos braços abertos ($100 \times \text{aberto} / \text{aberto} + \text{fechado}$) do LCE ou na periferia e centro da arena do CA bem como o tempo de “grooming” no teste “splash” e de imobilidade no teste do nado forçado foram calculados para cada rato. Estes dados foram analisados pela análise de variância de uma via (One-way ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. O nível de significância assumido para todos os testes foi de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Genotipagem

Os genes *reporters* são utilizados com modelos de animais transgênicos para produzir um sinal da presença da proteína relacionada (BRADER; SERGANOVA; BLASBERG, 2013). Em geral, é um sinal luminoso que pode ser fluorescente ou visível em luz branca, indicando a expressão da proteína de interesse (SOROLDONI; OATES, 2011).

Uma grande variedade de animais transgênicos foi desenvolvida como ferramenta para estudos de novos fármacos e de doenças (BELIZÁRIO *et al.*, 2012). Um dos genes *reporters* mais comuns empregados em ratos transgênicos é o lacZ, que é de origem bacteriana, como a *Escherichia coli*, e é responsável pela transcrição e tradução da enzima β -galactosidase (GHIM *et al.*, 2010; SMEYNE *et al.*, 1992). Essa enzima catalisa um substrato incolor chamado X-gal (5-bromo-4 cloro 3- indolil $-\beta$ -D- galactopiranosídeo) que, após a reação, produz um precipitado de cor azul, insolúvel e não tóxico para célula (SPERGEL *et al.*, 2001; ZAKANY *et al.*, 1988).

No presente projeto, o total de animais nascidos foram 215, sendo 109 machos e 106 fêmeas. Dos 215 animais, 81 testaram positivos para o gene lacZ, ou seja, aproximadamente 38% dos animais apresentaram o gene repórter em seu material genético (Figura 6), sendo 38 machos transgênicos c-fos lacZ e 43 fêmeas transgênicas c-fos lacZ.

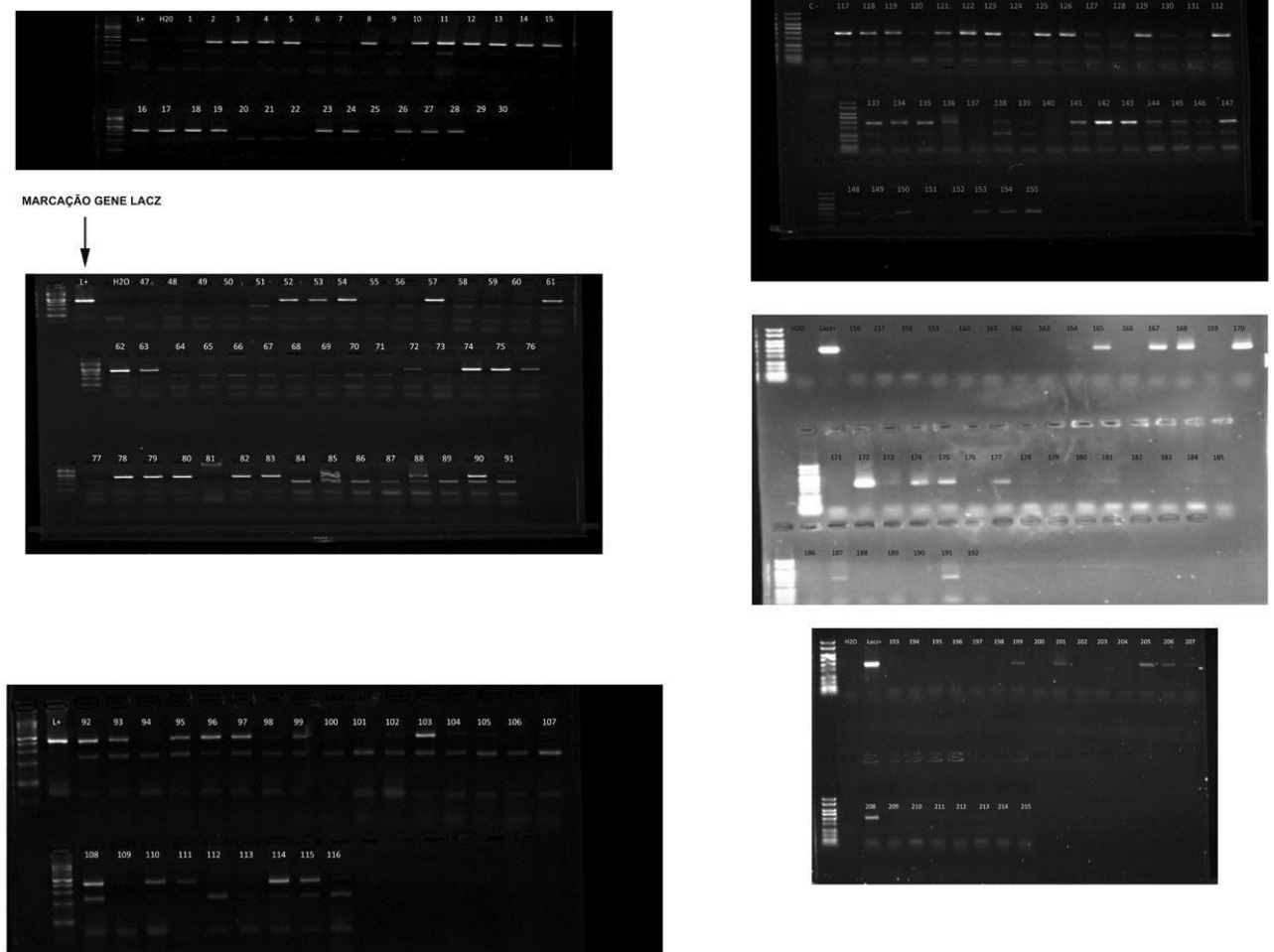


Figura 6. Amplificação por PCR do gene LacZ a partir de DNA genômico usando primer específico de *E. coli* LacZ. A figura mostra a eletroforese em gel de agarose, confirmando a presença do gene lacZ.

5.2 Ciclo Estral

Define-se estro como um conjunto de comportamentos e fenômenos de acasalamento que precedem e acompanham a ovulação na maioria dos mamíferos de sexo feminino, exceto os primatas (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2006; RODRIGUES; SASSO, [s. d.]; “Manejo Zootécnico – Biotério Laboratório Análise Neuro Comportamental (LANEC) PUC-Rio.” 2013). O estro ou cio, período da fase reprodutiva do animal, é comumente referido como dia zero do ciclo estral (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2006; RODRIGUES; SASSO, [s. d.]; “Manejo Zootécnico – Biotério Laboratório Análise Neuro Comportamental (LANEC) PUC-Rio.” 2013). A rata é um animal do tipo poliestro, ou seja, apresenta ciclos estrais rápidos e sucessivo (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2006; RODRIGUES; SASSO, [s. d.]; “Manejo Zootécnico – Biotério Laboratório Análise Neuro Comportamental (LANEC) PUC-Rio.” 2013). Em geral, as ratas apresentam um ciclo estral de 4-5 dias (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2006;

RODRIGUES; SASSO, [s. d.]). As fases do ciclo estral compreendem o proestro (15 horas, mais frequente à noite); o estro (12 horas, frequente durante o dia), o metaestro (12 horas) e o diestro (entre 48-62 horas) (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2006; RODRIGUES; SASSO, [s. d.]).

Devido a ação dos hormônios sexuais (estrogênios e progesterona) sobre o epitélio vaginal é possível avaliar a fase do ciclo estral. Os estrogênios causam proliferação e queratinização, e a progesterona promove mucificação. No presente projeto, foram alojadas 5 ratas por caixa, em um biotério somente contendo fêmeas. Analisando-se os tipos de células presentes no esfregaço vaginal foi possível identificar que durante o período de indução, previamente ao dia do teste, 100% das ratas encontravam-se na fase diestro. Nas lâminas, foi observado a presença de células epiteliais, leucócitos e muco (Figura 7). Nessa fase do ciclo estral, não ocorre cópula, nem lordose (postura semelhante a cópula).

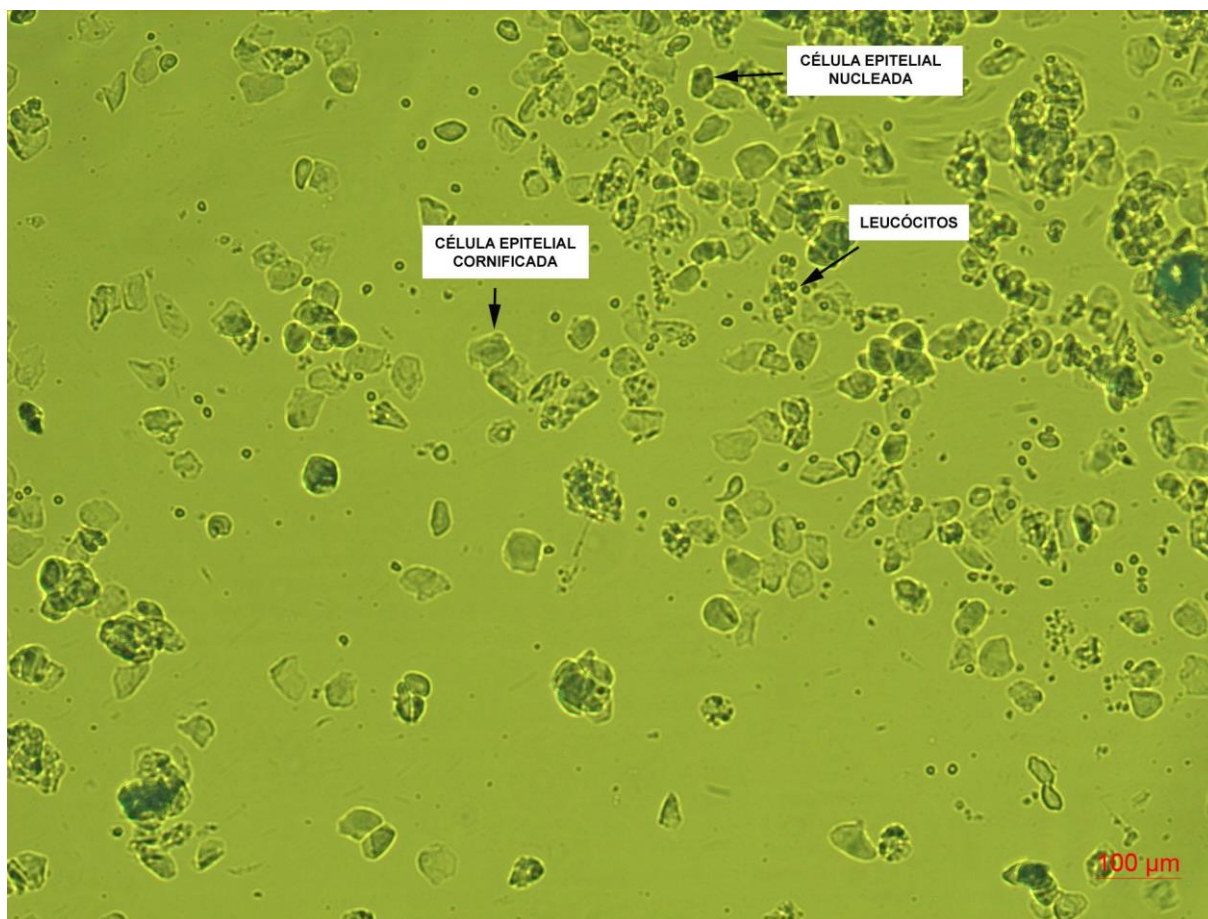


Figura 7. Avaliação histológica de esfregaço vaginal de uma rata representativa do grupo. A fase representada é a fase diestro, caracterizada pela presença de células epiteliais nucleadas e cornificadas e leucócitos.

5.3 Fotomicrografia no hipocampo ventral (HV)

Uma fotomicrografia representativa indicando os locais de injeção de veículo ou Daun02 no hipocampo ventral (VH) podem ser vistos na Figura 8.

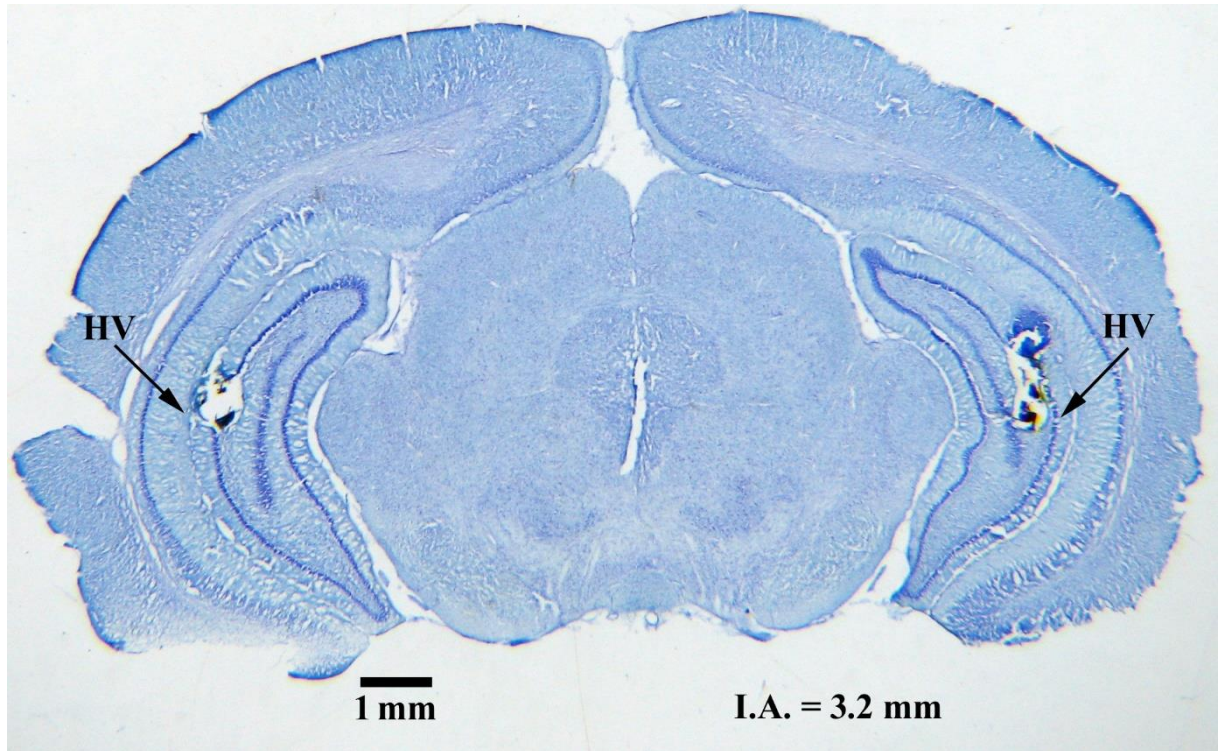


Figura 8. Fotomicrografia representativa indicando locais de injeção (setas) no Hipocampo Ventral (HV)

5.4 Efeito da inativação dos neurônios previamente ativados no HV durante a exposição a um protocolo de estresse crônico repetido por meio do procedimento de inativação Daun02 em ratos e ratas transgêneo(a)s c-fos-lacZ sobre o processo de habituação das respostas comportamentais do tipo ansiogênica e depressiva

LCE

Agudo: Ratos (n=5) e ratas (n=10) que foram tratados com veículo e submetidas ao RS apresentaram porcentagem do número de entradas (machos: $F(2, 12) = 0,01140$ $P=0,9887$ - fêmeas: $F(2, 31) = 1,841$, $P = 0,1755$) e o tempo gasto nos braços abertos (machos: $F(2, 12) = 0,8124$ $P=0,4710$ - fêmeas: $F(2, 31) = 2,112$, $P = 0,1381$), bem como o tempo gasto nos braços fechados (machos: $F(2, 12) = 0,7829$ $P=0,4832$ - fêmeas: $F(2, 31) = 1,108$, $P = 0,3429$) similares quando comparados com os animais que não foram submetidos ao estresse (naive machos = 5 - naive fêmeas = 12) ou quando comparados com os animais tratados com Daun02 e submetidos ao RS (Daun02+RS machos= 5 - Daun02+RS fêmea = 11) (Figura 9).

Crônico: Tanto os ratos (n=6) quanto as ratas (n=5) que foram tratados com veículo e submetidos ao CRS apresentaram porcentagem no tempo gasto nos braços abertos (machos: $F(2, 19) = 2,965$ $P=0,0757$ - fêmeas: $F(2, 15) = 2,072$ $P=0,1605$) similares quando comparados com os animais que não foram submetidos ao estresse (naive machos = 10 - naive fêmeas = 7) ou quando comparados com os animais tratados com Daun02 e submetidos ao CRS (Daun02+CRS machos = 6 - Daun02+CRS fêmeas = 6) (Figura 10). Nas ratas tratadas com veículo e submetidas ao CRS, a porcentagem do número de entradas nos braços abertos ($F(2, 15) = 4,421$ $P=0,0309$) foram significativamente maiores quando comparadas ao grupo grupo Daun02+CRS e sem diferença quando comparadas ao grupo naive. As ratas que foram tratados com veículo e submetidos ao CRS apresentaram tempo gasto nos braços fechados (fêmeas: $F(2, 15) = 1,147$, $P = 0,3440$) similares quando comparados com os animais naive ou quando comparados com os animais Daun02+CRS. Os ratos tratados com Daun02 e submetidos ao CRS apresentaram o tempo gasto nos braços fechados ($F(2, 19) = 4,415$ $P=0,0266$) significativamente maiores quando comparados ao do grupo naive e sem diferença ao grupo veículo+CRS (Figura 10).

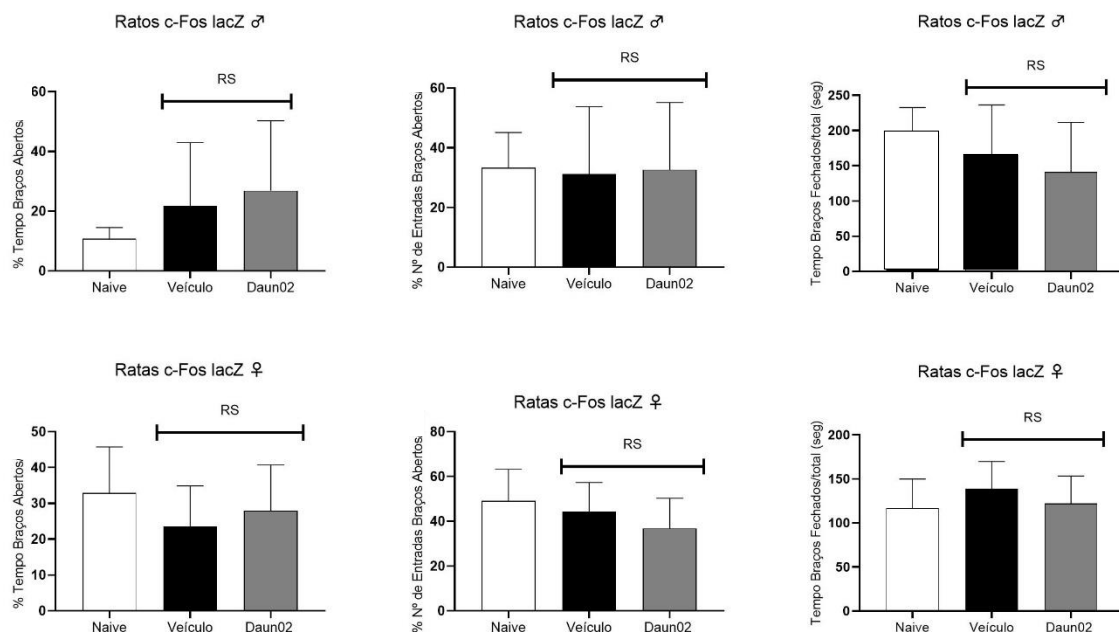


Figura 9 - Efeitos comportamentais observados 24 h após o estresse agudo de restrição (RS, 2h por 1 dia) no labirinto em cruz elevado (LCE) dos animais que foram tratados com veículo (200nL), barras pretas) ou Daun02 (0,8 µg / 0,2 µL / sítio, barras cinzas). Um grupo não-estressado (naive, barras brancas) foi usado como controle. Colunas representam as médias e as barras o EPM (pós-teste de Tukey, $P < 0,05$) * Diferente do grupo naive; ** Diferente do grupo veículo.

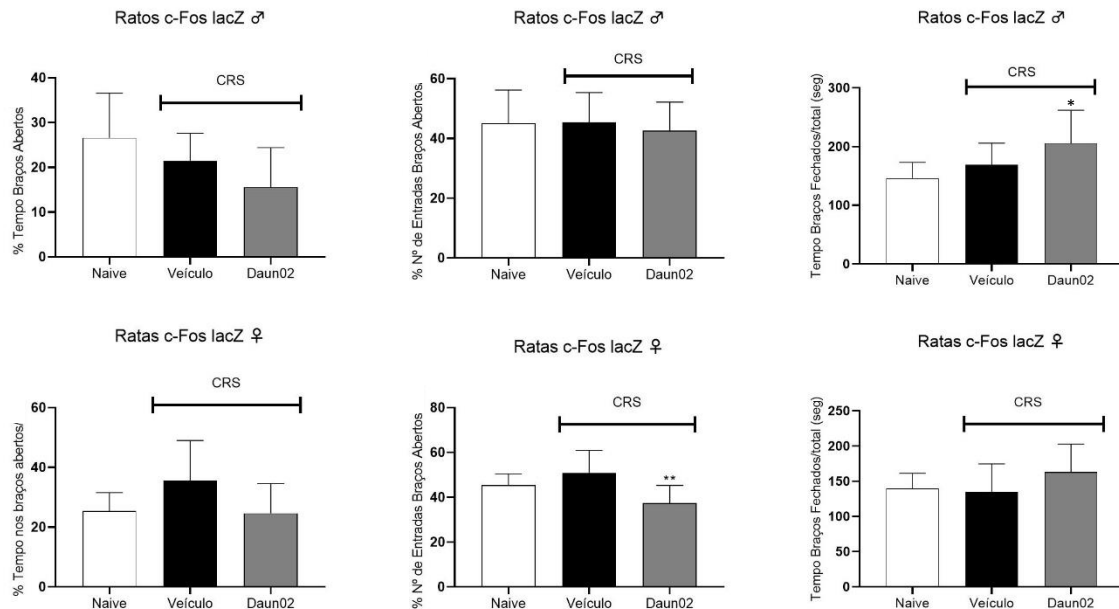


Figura 10 - Efeitos comportamentais observados 24 h após o estresse crônico de restrição CRS, 2h/dia por 21 dias) no labirinto em cruz elevado (LCE) dos animais que foram tratados com veículo (200nL, barras pretas) ou Daun02 (0,8 µg / 0,2 µL / sítio, barras cinzas). Um grupo não-estressado (naive, barras brancas) foi usado como controle. Colunas representam as médias e as barras o EPM (pós-teste de Tukey, $P < 0,05$) * Diferente do grupo naive; ** Diferente do grupo veículo.

CA

Agudo: Os ratos ($n=5$) e as ratas ($n=9$) que foram tratadas com veículo e submetidos ao RS apresentaram a distância percorrida (machos: $F(2, 12) = 2,315$ $P=0,1492$ - fêmeas: $F(2, 29) = 0,3752$ $P=0,6904$), o tempo gasto na periferia (machos: $F(2, 12) = 0,5702$ $P=0,5828$ - fêmeas: $F(2, 29) = 0,4943$ $P=0,6150$) e no centro da arena (machos: $F(2, 12) = 0,5702$ $P=0,5828$ - fêmeas: $F(2, 29) = 0,4943$ $P=0,6150$), similares quando comparados com os animais que não foram submetidos ao estresse (naive: machos=5 fêmea=12) ou quando comparados com os animais tratados com Daun02 e submetidos ao RS (Daun02+RS: machos=5 fêmea=11) (Figura 11).

Crônico: Os ratos ($n=6$) e ratas ($n=5$) que foram tratados com veículo e submetidos ao CRS apresentaram a distância percorrida (machos: $F(2, 21) = 0,2391$ $P=0,7895$ - fêmeas: $F(2, 15) = 0,7955$ $P=0,4695$), o tempo gasto na periferia (machos: $F(2, 21) = 0,1769$ $P=0,8391$ - fêmeas: $F(2, 15) = 0,7955$ $P=0,4695$) e no centro da arena (machos: $F(2, 21) = 0,3648$ $P=0,6987$ - fêmeas: $F(2, 15) = 0,2466$ $P=0,7845$), similares quando comparados com os

animais que não foram submetidos ao estresse (naive: machos=11 – fêmeas=6) ou quando comparados com os animais tratados com Daun02 e submetidos ao CRS (machos=7 – fêmeas=7) (Figura 12).

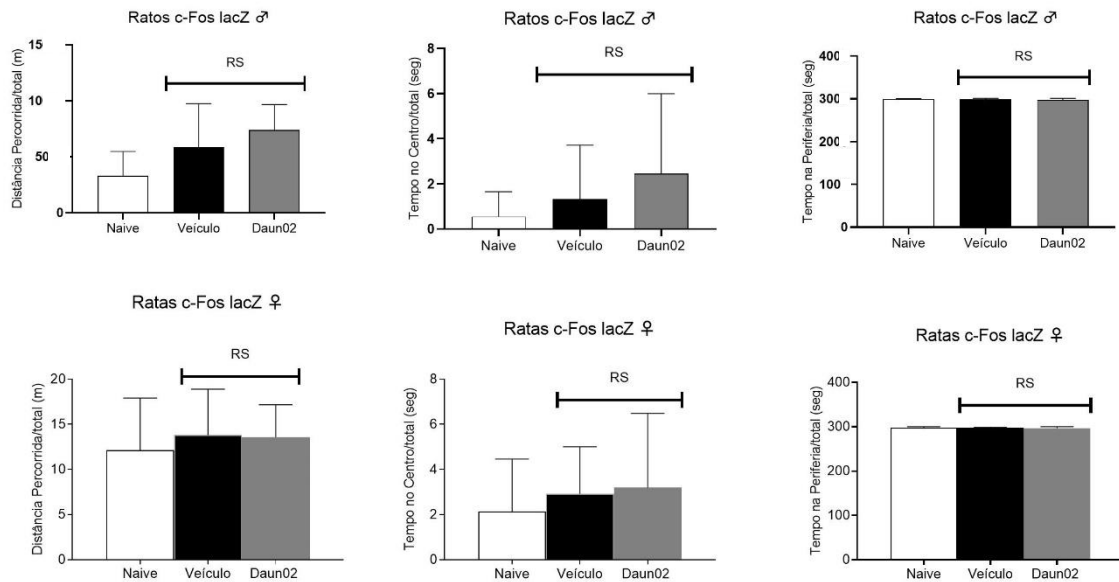


Figura 11 - Efeitos comportamentais observados 24 h após o estresse agudo de restrição (RS, 2h por 1 dia) no teste do campo aberto (CA) dos animais foram tratados com veículo (200nL, barras pretas) ou Daun02 (0,8 µg / 0,2 µL / sítio, barras cinzas). Um grupo não-estressado (naive, barras brancas) foi usado como controle. Colunas representam as médias e as barras o EPM (pós-teste de Tukey, P < 0,05)
 * Diferente do grupo naive; ** Diferente do grupo veículo.

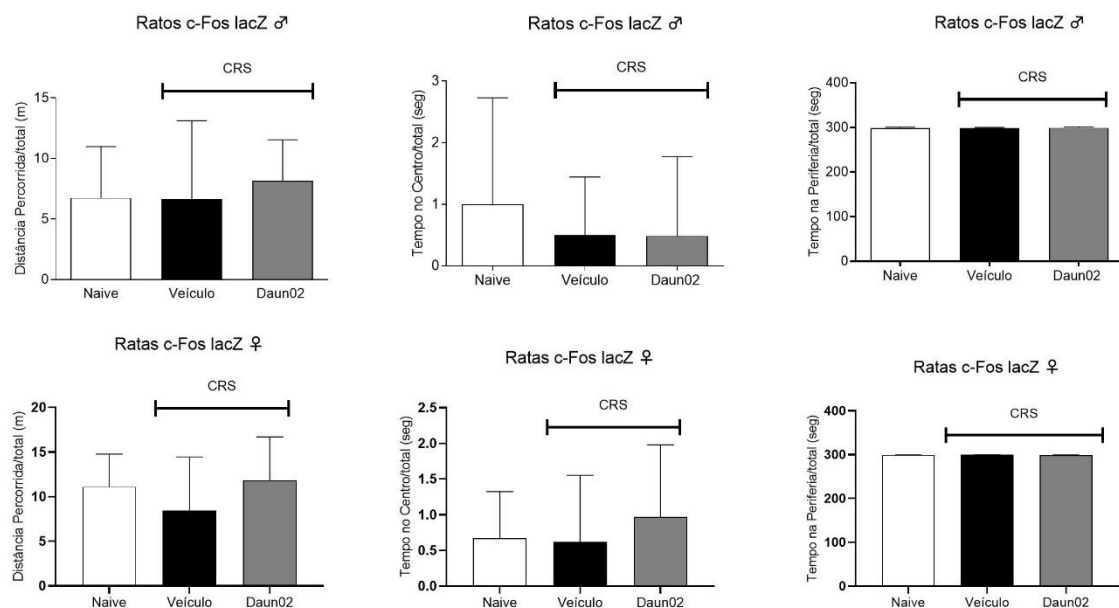


Figura 12 - Efeitos comportamentais observados 24 h após o estresse crônico de restrição (CRS, 2h por 21 dias) no teste do campo aberto (CA) dos animais foram tratados com veículo (200nL, barras pretas) ou Daun02 (0,8 µg / 0,2 µL / sítio, barras cinzas). Um grupo não-estressado (naive, barras brancas) foi usado como controle. Colunas representam as médias e as barras o EPM (pós-teste de Tukey, $P < 0,05$) * Diferente do grupo naive; **Diferente do grupo veículo.

ST

Agudo: Os ratos (n=5) e ratas (n=9) tratados com veículo e submetidas ao RS apresentaram tempo de “grooming” (auto limpeza) semelhante aos animais do grupo naive (sem estresse, machos=5 – fêmeas=8) e dos animais tratados com Daun02 (machos=5 – fêmeas=10) e submetidos aos RS (machos: $F(2, 12) = 1,040$ $P=0,3888$ – fêmeas: $F(2, 24) = 0,006388$ $P=0,9936$) (Figura 13).

Crônico: Os ratos tratados com veículo (n=6) e submetidos ao CRS apresentaram tempo de “grooming” (auto limpeza) maior que os animais do grupo naive (sem estresse, n=12) e semelhante aos animais tratados com Daun02 (n=8) e submetidos aos CRS ($F(2, 23) = 3,453$ $P=0,04880$) (Figura 14). As ratas tratadas com veículo (n=5) e submetidas ao CRS apresentaram tempo de “grooming” (auto limpeza) maior quando comparadas aos animais do grupo naive (sem estresse, n=8), e semelhante aos animais tratados com Daun02 (n=8) e submetidos aos CRS ($F(2, 18) = 3,444$ $P=0,0541$) ($P > 0,05$) (Figura 14).

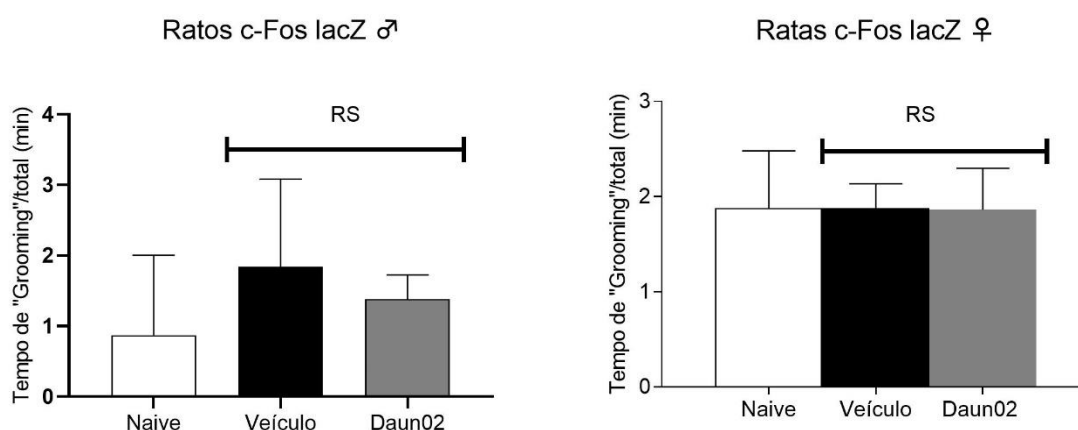


Figura 13 - Efeito comportamental observado 48h após o estresse agudo de restrição (RS, 2h por 1 dia) no teste Splash dos animais foram tratados com veículo (200nL, barras pretas) ou Daun02 (0,8 µg / 0,2 µL / sítio, barras cinzas). Um grupo não-estressado (naive, barra branca) foi usado como controle. Colunas representam as médias e as barras o EPM (pós-teste de Tukey, $P < 0,05$) * Diferente do grupo naive; ** Diferente do grupo veículo

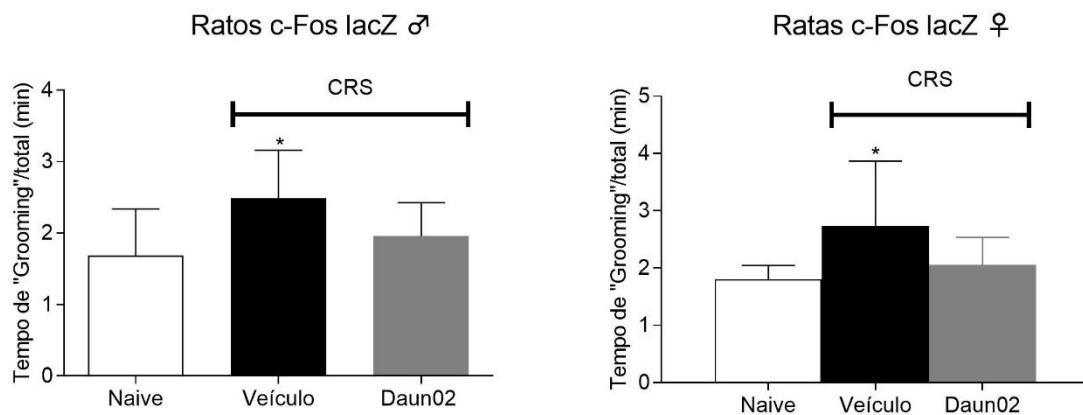


Figura 14 - Efeito comportamental observado 48h após o estresse crônico de restrição (CRS, 2h por 21 dias) no teste Splash dos animais foram tratados com veículo (200nL, barras pretas) ou Daun02 (0,8 µg / 0,2 µL / sítio, barras cinzas). Um grupo não-estressado (naive, barra branca) foi usado como controle. Colunas representam as médias e as barras o EPM (pós-teste de Tukey, $P < 0,05$) * Diferente do grupo naive; ** Diferente do grupo veículo

FST

Agudo: Os ratos que foram tratados com veículo ($n=5$) e submetidos ao RS apresentaram tempo de nado ($F(2, 12) = 2,513$ $P=0,1305$), escalada ($F(2, 12) = 2,365$ $P=0,1442$) e imobilidade ($F(2, 12) = 0,7580$ $P=0,4937$) semelhante aos animais naive (sem estresse, $n=5$), e aos animais tratados com Daun02 ($n=5$) e submetidos aos RS (Figura 15). Além disso, as ratas tratadas com veículo ($n=10$) e submetidas ao RS apresentaram tempo de nado semelhante quando comparadas aos animais naive (sem estresse, $n=12$) e aos animais tratados com Daun02 ($n=11$) e submetidos aos RS ($F(2, 30) = 3,157$ $P=0,0570$) (Figura 15). Contudo, as ratas tratadas com veículo e submetidas ao RS apresentaram uma diminuição no tempo de imobilidade quando comparadas aos animais naive (sem estresse) e aos animais tratados com Daun02 e submetidos ao RS ($F(2, 30) = 4,638$ $P=0,0176$), e um aumento no tempo de escalada quando comparadas aos animais naive (sem estresse) e aos animais Daun02+RS ($F(2, 30) = 5,673$ $P=0,0081$) (Figura 15).

Crônico: Os ratos ($n=6$) e as ratas ($n=5$) que foram tratados com veículo e submetidos ao CRS apresentaram tempos de nado (machos: $F(2, 23) = 1,532$ $P=0,2374$ – fêmeas: $F(2, 17) = 1,462$ $P=0,2612$) e escalada (machos: $F(2, 23) = 1,989$ $P=0,1597$ – fêmeas: $F(2, 17) = 2,035$ $P=0,1632$) semelhantes aos animais naive (sem estresse, machos=12 – fêmeas=8) e aos animais tratados com Daun02 (machos=8 – fêmeas=7) submetidos aos CRS (Figura 16). Além disso, os ratos tratados com veículo e submetidos ao CRS apresentaram um aumento no tempo de imobilidade quando comparados aos animais naive (sem estresse) ou aos

animais tratados com Daun02 e submetidos ao CRS (F (2, 23) = 4,370 P=0,0246) (Figura 16). As ratas que foram tratadas com Daun02 e submetidas ao CRS apresentaram um aumento no tempo de imobilidade quando comparadas com os animais tratados com veículo e quando comparadas com os animais naive (sem estresse) (F (2, 17) = 5,112 P=0,0192) (Figura 16).

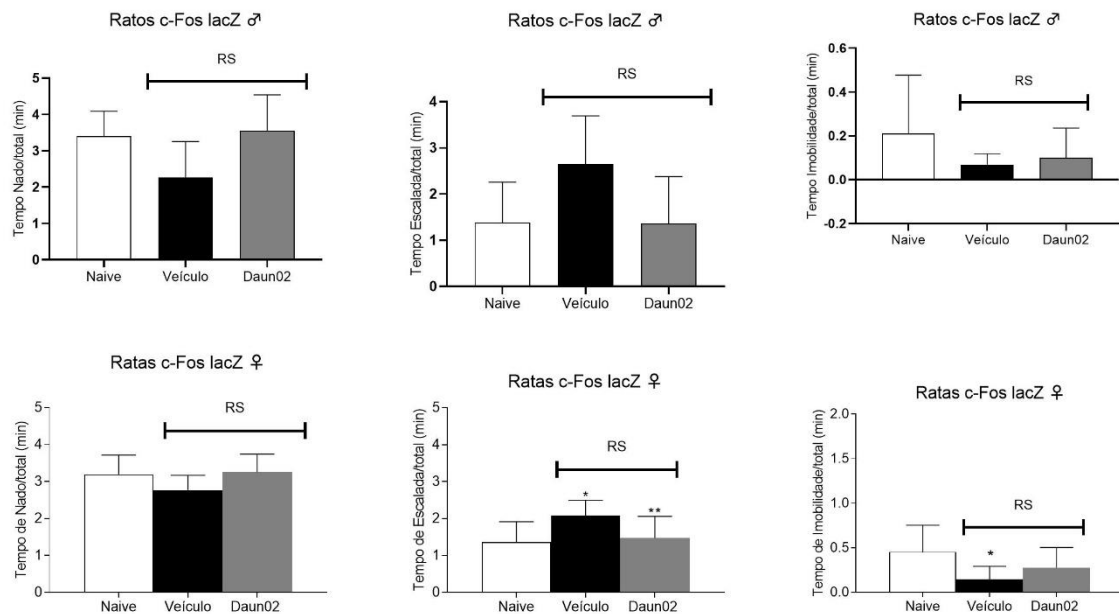


Figura 15 - Efeito comportamental observado 48h após o estresse agudo de restrição (RS, 2h por 1 dia) no teste do nado forçado dos animais que foram tratados com veículo (200nL, barras pretas) ou Daun02 (0,8 µg / 0,2 µL / sítio, barras cinzas).. Um grupo não-estressado (naive, barra branca) foi usado como controle. Colunas representam as médias e as barras o EPM (pós-teste de Tukey, P <0,05) * Diferente do grupo naive; **Diferente do grupo veículo.

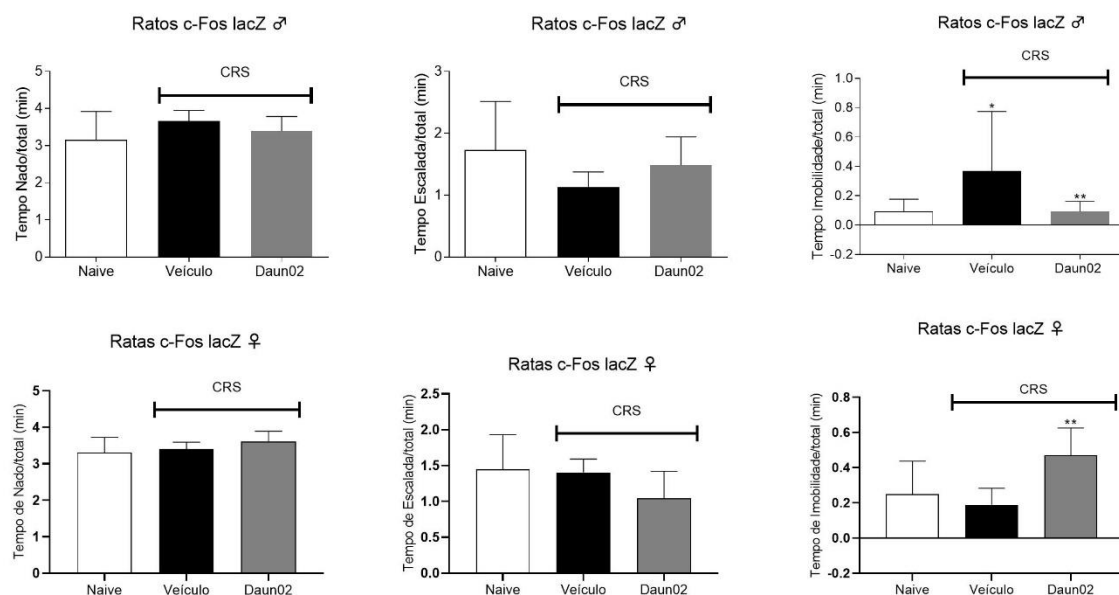


Figura 16 - Efeito comportamental observado 48h após o estresse crônico de restrição (CRS, 2h por 21 dias) no teste do nado forçado dos animais que foram tratados com veículo (200nL, barras pretas) ou Daun02 (0,8 µg / 0,2 µL / sítio, barras cinzas). Um grupo não-estressado (naive, barra branca) foi usado como controle. Colunas representam as médias e as barras o EPM (pós-teste de Tukey, $P < 0,05$) * Diferente do grupo naive; ** Diferente do grupo veículo.

Apesar das diferenças sexuais documentadas na incidência de distúrbios neuropsiquiátricos relacionados ao estresse, há poucos estudos experimentais na literatura que compare os efeitos do estresse em animais machos e fêmeas (OLAVE *et al.*, 2022) No presente trabalho, nós estudamos os efeitos do estresse agudo e crônico de restrição, bem como o papel do HV sobre as respostas comportamentais em ratos e ratas lacZ.

O comportamento relacionado à ansiedade foi avaliado nos testes do LCE e do CA 24h após a 1° (agudo) ou 21° (crônico) sessão de restrição. O LCE é um teste que consiste em expor os animais livremente por cinco minutos no aparato e estima o índice de ansiedade dos animais através da avaliação da exploração dos braços abertos do mesmo (BUSNARDO *et al.*, 2019; JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003; KORTE; DE BOER, 2003). Imediatamente após o LCE, os animais foram testados individualmente no CA, que consiste em expor os animais livremente por cinco minutos a uma arena aberta, e o índice de ansiedade dos animais pode ser avaliado pela análise da exploração do centro da arena (SPIACCI *et al.*, 2016). Os resultados apresentados acima demonstram que o RS ou CRS não causou alterações na exploração dos braços abertos no LCE ou do CA em ambos os sexos dos animais lacZ, sugerindo a princípio que nenhum dos modelos de estresse (agudo ou crônico) induziu um efeito do tipo ansiogênico ou ansiolítico. A falta de efeito do estresse agudo ou do tratamento nos animais agudamente estressados deve-se, provavelmente, ao baixo número de animais por grupo, uma vez que respostas comportamentais apresentam uma variabilidade muito alta. As ratas cronicamente estressadas e que tiveram o HV tratado com Daun02 apresentaram uma redução na exploração dos braços abertos no LCE quando comparados com as ratas cronicamente estressadas e que tiveram o HV tratado com veículo, sugerindo que a inibição do HV promove um efeito do tipo ansiogênico. Esse dado levanta a hipótese de que o estresse crônico nas ratas lacZ promove um efeito do tipo ansiolítico, uma vez que há uma clara tendência em um aumento no número de entrada nos braços abertos no LCE nas ratas veículo+CRS quando comparadas com as ratas não estressadas (naive) e a ausência de diferença estatística entre esses grupos pode ser em decorrência de ter atingido um efeito (ansiolítico) teto nas ratas veículo+CRS. Os ratos cronicamente estressados parecem apresentar uma resposta ao estresse oposta à das fêmeas. Os ratos cronicamente estressados, apresentaram uma tendência a diminuição na porcentagem de tempo nos braços abertos do LCE quando comparados aos ratos não estressados (naive), sugerindo que o

estresse crônico promoveu um comportamento do tipo ansiogênico retardado nos ratos lacZ. Além disso, os ratos cronicamente estressados e que tiveram o HV tratado com Daun02 não apresentaram alteração na exploração dos braços abertos do LCE quando comparados com os ratos cronicamente estressados e que tiveram o HV tratado com veículo, sugerindo que HV não participa do efeito do tipo ansiogênico induzido pelo estresse em machos. Em conjunto, os presentes resultados mostram que o HV é capaz de modular diferentemente as respostas comportamentais induzidas por estresse dependendo do tipo de estresse (agudo x crônico) e do sexo (macho x fêmea). Nesse sentido, foi demonstrado que fêmeas de roedores apresentam um comportamento do tipo ansiogênico menor do que os machos em tarefas comportamentais não estressantes (DONNER; LOWRY, 2013; OLAVE *et al.*, 2022). Nossos dados também corroboram com os da literatura que demonstram que há um aumento do comportamento do tipo ansiogênico em ratos submetidos ao estresse crônico, enquanto as ratas apresentam respostas mais discrepantes, provavelmente dependendo do tipo de tarefa empregada, estressor e ciclo estral (OLAVE *et al.*, 2022; TER HORST *et al.*, 2012; ULLOA *et al.*, 2010).

O comportamento relacionado à depressão foi avaliado nos testes do ST e do FST 48 h após a 1º (agudo) ou 21º (crônico) sessão de restrição. O Splash Test consiste na aplicação de uma solução de sacarose 10% no dorso dos animais com o auxílio de um spray, para estimular o grooming, utilizado como índice de comportamento motivacional e de autocuidado. Imediatamente após o ST, os animais foram testados individualmente no FST que é um modelo animal para estudo de comportamento do tipo depressivo por apresentar alto valor preditivo para fármacos antidepressivos HEMBY *et al.*, 1997; (CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005; PAGE *et al.*, 1999; RÉNÉRIC; BOUVARD; STINUS, 2002; LÓPEZ RUALCAVA, 2000). O animal tentará primeiro escapar, mas eventualmente exibirá imobilidade, ou seja, flutuando com a ausência de qualquer movimento, exceto aqueles necessários para manter o nariz acima da água (YANKELEVITCH-YAHAV *et al.*, 2015). Os resultados apresentados acima demonstram que CRS, mas não o RS, causou um aumento no tempo de “grooming” no ST em ambos os sexos dos animais lacZ, tratados com veículo sugerindo a princípio que o estresse crônico induziu overgrooming. O grooming (comportamento de higiene) tem a função essencial de cuidar e proteger a superfície do corpo, mas sua ocorrência pode ser mais bem explicada considerando o contexto e não o estado da pele ou da pelagem (ESTANISLAU, 2012). De fato, esse comportamento pode ser induzido pela exposição a muitos estressores (para revisão, ver SPRUIJT; VAN HOOFF; GISPEN, 1992). Já no FST, o RS não causou nenhuma alteração nos parâmetros analisados (nado, escalada e imobilidade nos ratos lacZ). No entanto, o RS causou um aumento do tempo de escalada e uma redução no tempo de imobilidade nas fêmeas que foi revertido nos animais agudamente estressados e tratados com

Daun02, sugerindo que o HV participa do efeito do tipo antidepressivo induzido por estresse agudo nas ratas lacZ. O CRS causou um aumento no tempo de imobilidade nos ratos lacZ que foi revertido nos animais cronicamente estressados e tratados com Daun02, sugerindo que o HV participa do efeito depressivo induzido pelo estresse crônico em machos. Nossos resultados corroboram com dados da literatura que mostraram uma maior imobilidade no teste do nado forçado, realizado 96h após a última sessão de restrição, sendo considerado um comportamento preditivo de depressão (CHIBA *et al.*, 2012). Portanto, as consequências emocionais do estresse crônico em machos parecem ser decorrentes de uma má adaptação do estresse. Os glicocorticóides liberados durante o estresse induzem a liberação de citocinas (ex: IL-1 beta, IL-6, TNF-alfa) pró-inflamatórias o que pode levar a consequências comportamentais em longo prazo como comportamento do tipo depressão depressiva (GARCÍA-BUENO; CASO; LEZA, 2008). Portanto, a exposição ao estresse crônico poderia induzir neuroinflamação no hipocampo, levando a resposta comportamental do tipo depressivo em machos. Interessantemente, o CRS causou uma redução no tempo de imobilidade nas ratas lacZ que foi revertida nos animais cronicamente estressados e tratados com Daun02, sugerindo que o HV participa do efeito antidepressivo induzido pelo estresse crônico em fêmeas. Corroborando com isso, um estudo recente da literatura (OLAVE *et al.*, 2022) mostrou que o estresse crônico de restrição (2,5 h por dia por 14 dias) não causou perda de preferência por sacarose em fêmeas, enquanto melhorou o desempenho espacial, sugerindo que ratas são resilientes à exposição ao estresse crônico nos testes de preferência de sacarose e localização de objetos.

Uma possível explicação para esse controle diferencial entre o tipo de estresse e gênero do animal, seria a capacidade da amígdala modular o hipocampo durante situações estressantes, uma vez que a amígdala é importante na elaboração de respostas emocionais frente a ameaças (JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003). Ela pode atribuir significado (positivo ou negativo) a novas experiências e modular processos plásticos sediados no hipocampo envolvidos com o processamento de informações (MCGAUGH, 2000), especialmente durante situações de estresse (JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003). Corroborando com isso, ratos submetidos a estresse crônico apresentaram retração dendrítica em neurônios glutamatérgicos do hipocampo, enquanto que ratas não apresentam retração dendrítica em qualquer fase do estro (MCLAUGHLIN *et al.*, 2010; QIAO *et al.*, 2016). No entanto, futuros experimentos são necessários para confirmar essa hipótese.

6 CONCLUSÃO

Embora as respostas ao estresse estejam bem estabelecidas na literatura, os dados do presente trabalho contribuem para caracterizar os mecanismos neurais envolvidos nas respostas adaptativas do estresse. Em conclusão, os presentes resultados mostram que o hipocampo ventral está envolvido na mediação do efeito ansiolítico induzido pelo estresse crônico em ratas lacZ. Além disso, o hipocampo ventral está relacionado com o efeito depressivo induzido pelo estresse crônico em ratos lacZ bem como o comportamento do tipo antidepressivo induzido pelo estresse agudo e crônico em ratas lacZ. Dessa forma, a natureza e extensão dessas diferenças fornecem novas evidências para a compreensão de fenótipo pró-resiliente ou pró-suscetível a doenças relacionadas ao estresse.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, Antenor; PINTO, Sergio Correia; OLIVEIRA, Rosilene Santos De. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. [S. l.: s. n.], 2006.
- BANNERMAN, D. M. *et al.* Regional dissociations within the hippocampus - Memory and anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 273–283, 2004.
- BELIZÁRIO, José E. *et al.* New routes for transgenesis of the mouse. **Journal of Applied Genetics**, [s. l.], v. 53, n. 3, p. 295–315, 2012.
- BERTOGLIO, Leandro José; JOCA, Sâmia Regiane Lourenço; GUIMARÃES, Francisco Silveira. Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 175, n. 1, p. 183–188, 2006.
- BIRD, Chris M.; BURGESS, Neil. The hippocampus and memory: Insights from spatial processing. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 182–194, 2008.
- BRADER, Peter; SERGANOVA, Inna; BLASBERG, Ronald G. Noninvasive molecular imaging using reporter genes. **Journal of Nuclear Medicine**, [s. l.], v. 54, n. 2, p. 167–172, 2013.
- BROOKMEYER, Ron; GRAY, Sarah; KAWAS, Claudia. IT Papier und M-real mit VIP Event in St. Wolfgang: Printers Club. **Papier Und Druck**, [s. l.], v. 110, n. 4, p. 18–19, 2004.
- BUSNARDO, Cristiane *et al.* Nitrergic neurotransmission in the paraventricular nucleus of the hypothalamus modulates autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to acute restraint stress in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 90, p. 16–27, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.11.001>.
- CHIBA, Shuichi *et al.* Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 112–119, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.05.018>.
- CHRISTIAN, K. M. *et al.* Chronic stress-induced hippocampal dendritic retraction requires CA3 NMDA receptors. **Neuroscience**, [s. l.], v. 174, p. 26–36, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.11.033>.
- CLARK, R. E.; ZOLA, S. M.; SQUIRE, L. R. Impaired recognition memory rats after damage to the hippocampus. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 20, n. 23, p. 8853–8860, 2000.
- CORA, Michelle C.; KOOISTRA, Linda; TRAVLOS, Greg. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. **Toxicologic Pathology**, [s. l.], v. 43, n. 6, p. 776–793, 2015.
- CRESTANI, Carlos C. Emotional stress and cardiovascular complications in animal models: A review of the influence of stress type. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 7, n. June, 2016.
- CRUZ, Fabio C. *et al.* New technologies for examining neuronal ensembles in drug addiction and fear. **Nature reviews. Neuroscience**, [s. l.], v. 14, n. 11, p. 743, 2013. Disponível em: [/pmc/articles/PMC4530016/](http://pmc/articles/PMC4530016/). Acesso em: 22 abr. 2022.

CRYAN, John F.; VALENTINO, Rita J.; LUCKI, Irwin. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 29, n. 4–5, p. 547–569, 2005.

CURRAN, T *et al.* Structure of the FBJ murine osteosarcoma virus genome: molecular cloning of its associated helper virus and the cellular homolog of the v-fos gene from mouse and human cells. **Molecular and Cellular Biology**, [s. l.], v. 3, n. 5, p. 914–921, 1983.

DE SOUSA, Maria Bernardete Cordeiro; SILVA, Hélderes Peregrino A.; GALVÃO-COELHO, Nicole Leite. Resposta ao estresse: I. Homeostase e teoria da alostase. **Estudos de Psicologia**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 2–11, 2015.

DHABHAR, Firdaus S. The power of positive stress—a complementary commentary. **Stress**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 526–529, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10253890.2019.1634049>.

DONNER, Nina C.; LOWRY, Christopher A. Sex differences in anxiety and emotional behavior. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, [s. l.], v. 465, n. 5, p. 601–626, 2013.

ESTANISLAU, C. Cues to the usefulness of grooming behavior in the evaluation of anxiety in the elevated plus-maze. **Psychology and Neuroscience**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 105–112, 2012.
GALEN, J. Gender-Related Cognitive Deficits in Alzheimer ' s Disease. [s. l.], v. 11, n. 2, p. 117–122, 1999.

GARCÍA-BUENO, Borja; CASO, Javier R.; LEZA, Juan C. Stress as a neuroinflammatory condition in brain: Damaging and protective mechanisms. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 1136–1151, 2008.

GHIM, Cheol Min *et al.* The art of reporter proteins in science: Past, present and future applications. **BMB Reports**, [s. l.], v. 43, n. 7, p. 451–460, 2010.

GIROTTI, M. *et al.* Habituation to repeated restraint stress is associated with lack of stress-induced c-fos expression in primary sensory processing areas of the rat brain. **Neuroscience**, [s. l.], v. 138, n. 4, p. 1067–1081, 2006.

GOEL, Nirupa *et al.* Sex differences in the HPA axis. **Comprehensive Physiology**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 1121–1155, 2014.

GUNNAR, Megan; QUEVEDO, Karina. The neurobiology of stress and development. **Annual Review of Psychology**, [s. l.], v. 58, p. 145–173, 2007.

GUTIÉRREZ-LOBOS, Karin *et al.* The influence of age on the female/male ratio of treated incidence rates in depression. **BMC Psychiatry**, [s. l.], v. 2, p. 1–8, 2002.

HABIB, Yaribeygi. *et al.* Review article : Impact Of Stress On Body Function. [s. l.], p. 1057–1072, 2017.

HOLLAND, Peter C.; BOUTON, Mark E. Hippocampus and context in classical conditioning. **Current Opinion in Neurobiology**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 195–202, 1999.

IRVINE, Karen *et al.* Greater cognitive deterioration in women than men with Alzheimer's disease: A meta analysis. **Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology**, [s. l.], v. 34, n. 9, p. 989–998, 2012.

JOCA, Sâmia Regiane L; PADOVAN, Cláudia Maria; GUIMARÃES, Francisco Silveira. Estresse, depressão e hipocampo. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, [s. l.], v. 25, n. suppl 2, p. 46–51, 2003.

JONES, M. T.; BRUSH, F. R.; NEAME, R. L. Characteristics of fast feedback control of corticotrophin release by corticosteroids. **The Journal of endocrinology**, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 489–497, 1972.

KASOF, Gary M. *et al.* Developmental expression of Fos-lacZ in the brains of postnatal transgenic rats. **Developmental Brain Research**, [s. l.], v. 93, n. 1–2, p. 191–197, 1996.

KASOF, G. M. *et al.* Kainic acid-induced neuronal death is associated with DNA damage and a unique immediate-early gene response in c-fos-lacZ transgenic rats. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 4238–4249, 1995.

KITAY, J. I. Sex differences in adrenal cortical secretion in the rat. **Endocrinology**, [s. l.], v. 68, n. 4, p. 818–824, 1961.

KORTE, S. Mechiel; DE BOER, Sietse F. A robust animal model of state anxiety: Fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 463, n. 1–3, p. 163–175, 2003.

KOYA, Eisuke; MARGETTS-SMITH, Gabriella; HOPE, Bruce T. Daun02 inactivation of behaviorally activated fos-expressing neuronal ensembles. **Current Protocols in Neuroscience**, [s. l.], v. 2016, p. 8.36.1–8.36.17, 2016.

KUDIELKA, Brigitte M.; KIRSCHBAUM, Clemens. Sex differences in HPA axis responses to stress: A review. **Biological Psychology**, [s. l.], v. 69, n. 1 SPEC. ISS., p. 113–132, 2005.

LIN, George Guan-hua; SCOTT, Jeffrey G. Neural Regulation of Endocrine and Autonomic Stress Responses. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 397–409, 2009.

López-Rubalcava C, Lucki I. Strain differences in the behavioral effects of antidepressant drugs in the rat forced swimming test. *Neuropsychopharmacology*. 2000;22(2):191-199. doi:10.1016/S0893-133X(99)00100-1

MATCHYNSKI, James I. *et al.* Direct measurement of neuronal ensemble activity using photoacoustic imaging in the stimulated Fos-LacZ transgenic rat brain: A proof-of-principle study. **Photoacoustics**, [s. l.], v. 24, n. July, p. 100297, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pacs.2021.100297>.

MCEWEN, Bruce S. Stress Mediators. [s. l.], v. 583, p. 174–185, 2009.

MCGAUGH, James L. Memory - A century of consolidation. **Science**, [s. l.], v. 287, n. 5451, p. 248–251, 2000.

MCLAUGHLIN, Katie J. *et al.* Chronic 17 β -estradiol or cholesterol prevents stress-induced hippocampal CA3 dendritic retraction in ovariectomized female rats: Possible correspondence between CA1 spine properties and spatial acquisition. **Hippocampus**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 768–786, 2010.

MÜLLER, Heidi Kaastrup *et al.* Differential expression of synaptic proteins after chronic restraint stress in rat prefrontal cortex and hippocampus. **Brain Research**, [s. l.], v. 1385, p. 26–37, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2011.02.048>.

OLAVE, Felipe A. *et al.* Chronic restraint stress produces sex-specific behavioral and

molecular outcomes in the dorsal and ventral rat hippocampus. **Neurobiology of Stress**, [s. l.], v. 17, n. February, 2022.

Padovan, C. M., & Guimarães, F. S. (1993). Attenuation of behavioral consequences of immobilization stress by intra-hippocampal microinjection of zimelidine. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 26(10), 1085–1089.

PAGE, Michelle E. *et al.* Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 147, n. 2, p. 162–167, 1999.

PAPADOPOULOS, Andrew S.; CLEARE, Anthony J. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction in chronic fatigue syndrome. **Nature Reviews Endocrinology**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 22–32, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2011.153>.

QIAO, Hui *et al.* Dendritic Spines in Depression: What We Learned from Animal Models. **Neural Plasticity**, [s. l.], v. 2016, p. 20–24, 2016.

RÉNÉRIC, Jean Philippe; BOUVARD, Manuel; STINUS, Luis. In the rat forced swimming test, chronic but not subacute administration of dual 5-HT/NA antidepressant treatments may produce greater effects than selective drugs. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 136, n. 2, p. 521–532, 2002.

RODRIGUES, Gisela; SASSO, Silva. Ciclo estral da rata. [s. l.], p. 860,
SAGAR, S. M.; SHARP, F. R.; CURRAN, T. Expression of c-fos protein in brain: Metabolic mapping at the cellular level. **Science Science**, [s. l.], v. 240, n. 4857, p. 1328–1331, 1988.

S. E. Hemby, I. Lucki, G. Gatto, A. Singh, C. Thornley, J. Matasi, N. Kong, J. E. Smith, H. M. L. Davies and S. I. Dworkin, “Potential Antidepressant Effects of Novel Tropane Compounds, Selective for Serotonin or Dopamine Transporters,” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Vol. 282, No. 2, 1997, pp. 727-733.

SAPOLSKY, Robert M.; ROMERO, L. Michael; MUNCK, Allan U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrine Reviews**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 55–89, 2000.

SCHILLING, Karl *et al.* Regulation of a fos-lacZ fusion gene: A paradigm for quantitative analysis of stimulus-transcription coupling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 88, n. 13, p. 5665–5669, 1991.

SCOPINHO, América A. *et al.* Dorsal and Ventral Hippocampus Modulate Autonomic Responses but Not Behavioral Consequences Associated to Acute Restraint Stress in Rats. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 10, p. 2–11, 2013.

SEPÚLVEDA ANGULO, María Teresa *et al.* Ciclo estral del ratón hembra intacto y ovariectomizado. **Acta Universitaria**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 5–8, 2012.

Sex Differences in the Brain: From Genes to Behavior - Oxford Scholarship. (n.d.). Oxford Scholarship Online. Retrieved July 3, 2022, from <https://oxford.universitypressscholarship.com/view/10.1093/acprof:oso/9780195311587.001.0001/acprof-9780195311587>

SHAPERO, Benjamin G. *et al.* The interactive association of proximal life stress and

cumulative HPA axis functioning with depressive symptoms. **Depression and Anxiety**, [s. l.], v. 36, n. 11, p. 1089–1101, 2019.

SMEYNE, Richard J. *et al.* Fos-lacZ transgenic mice: Mapping sites of gene induction in the central nervous system. **Neuron**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 13–23, 1992.

SOROLDONI, Daniele; OATES, Andrew C. Live transgenic reporters of the vertebrate embryo's Segmentation Clock. **Current Opinion in Genetics and Development**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 600–605, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2011.09.006>.

SPERGEL, Daniel J. *et al.* Using reporter genes to label selected neuronal populations in transgenic mice for gene promoter, anatomical, and physiological studies. **Progress in Neurobiology**, [s. l.], v. 63, n. 6, p. 673–686, 2001.

SPIACCI, Ailton *et al.* 5-HT_{1A} receptors of the rat dorsal raphe lateral wings and dorsomedial subnuclei differentially control anxiety- and panic-related defensive responses. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 107, p. 471–479, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.06.015>.

SPRUIJT, B. M.; VAN HOOFF, J. A.R.A.M.; GISPEN, W. H. Ethology and neurobiology of grooming behavior. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 72, n. 3, p. 825–852, 1992.

STRANGE, Bryan A. *et al.* Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 15, n. 10, p. 655–669, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3785>.

STROUD, Laura R.; SALOVEY, Peter; EPEL, Elissa S. Sex differences in stress responses: Social rejection versus achievement stress. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 52, n. 4, p. 318–327, 2002.

TER HORST, J. P. *et al.* Relevance of stress and female sex hormones for emotion and cognition. **Cellular and Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 32, n. 5, p. 725–735, 2012.

ULLOA, J. L. *et al.* Comparison of the antidepressant sertraline on differential depression-like behaviors elicited by restraint stress and repeated corticosterone administration. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 97, n. 2, p. 213–221, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2010.08.001>.

WATANABE, Yoshifumi; GOULD, Elizabeth; MCEWEN, Bruce S. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. **Brain Research**, [s. l.], v. 588, n. 2, p. 341–345, 1992.

WILTGEN, Brian J. *et al.* Context fear learning in the absence of the hippocampus. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 26, n. 20, p. 5484–5491, 2006.

YAGI, Shunya; GALEA, Liisa A.M. Sex differences in hippocampal cognition and neurogenesis. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 200–213, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41386-018-0208-4>.

YANKELEVITCH-YAHAV, Roni *et al.* The forced swim test as a model of depressive-like behavior. **Journal of Visualized Experiments**, [s. l.], v. 2015, n. 97, p. 1–7, 2015.

ZAKANY, Jozsef *et al.* Spatial regulation of homeobox gene fusions in the embryonic central nervous system of transgenic mice. **Neuron**, [s. l.], v. 1, n. 8, p. 679–691, 1988.

